

Funktionelle Analyse von CAP bei der Herzlumenbildung von *Drosophila melanogaster*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom Biologin Jennifer Jammrath

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekanin/Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Saumweber
2. Prof. Dr. Seyfried
3. Prof. Dr. Paululat

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2015

Zusammenfassung

Das Dorsalgefäß von *Drosophila* ist ein wertvolles Modellsystem für die Untersuchung der genetischen und molekularen Mechanismen der Kardiogenese. Ein Schlüsselereignis der Kardiogenese ist die Bildung eines Herzlumens, durch das die Hämolymphe gepumpt wird, um Nährstoffe und Zellen des angeborenen Immunsystems zu zirkulieren.

Ein Schwerpunkt meiner Arbeit umfasste die Identifizierung neuer Gene, die im embryonalen Dorsalgefäß von *Drosophila* exprimiert sind. Dafür habe ich die Expression von 101 Genen, deren Orthologe spezifisch im Herzen von Zebrafisch exprimiert sind, in *Drosophila* untersucht. Ich identifizierte ein Gen, das für das Cbl-assoziierte Protein (CAP) kodiert. Durch Herstellung eines anti-CAP Antikörpers konnte ich erstmals eine detaillierte Lokalisation des CAP-Proteins im Dorsalgefäß beschreiben. Interessanterweise stellte sich dabei heraus, dass CAP ähnlich wie die homologen Vertebraten Proteine embryonal an den fokalen Adhäsionskontakten der Kardioblasten und im adulten Dorsalgefäß auch an den Z-Scheiben und den Zell-Zell-Kontaktstellen der Kardiomyozyten lokalisiert ist. Des Weiteren untersuchte ich, welche Auswirkungen der Verlust der CAP Funktion auf die Herzentwicklung hat. Für die Analyse der CAP-Mutanten nutzte ich neben Immunhistochemischen Methoden auch ultrastrukturelle Analysen mittels TEM-Mikroskopie. So konnte ich zeigen, dass embryonale Dorsalgefäße von CAP-Mutanten eine fehlerhafte Anzahl sowie Anordnung der Kardioblasten und Lumendefekte aufweisen. Ein genetischer Interaktionstest untermauerte meine Vermutung, dass CAP mit dem Integrinsignalweg während der embryonalen Dorsalgefäßentwicklung interagiert. Live-Aufnahmen des pumpenden Dorsalgefäßes von *Drosophila* L3-Larven und Injektionstests an späten Puppen zeigten zudem, dass der Verlust der CAP Funktion auch zu starken Defekten in der Funktionalität des larvalen und adulten Dorsalgefäßes führt.

Schlagwörter: Dorsalgefäß, Herzlumen, Cbl-assoziiertes Protein (CAP), Integrin

Abstract

The heart of *Drosophila* provides a valuable model system for the examination of the genetic and molecular mechanisms that guide cardiogenesis. A key event of cardiogenesis is the formation of a heart lumen through which the hemolymph is pumped to circulate nutrients and cells of the innate immune system.

A main focus of my work was the identification of new genes that are expressed in the embryonic heart of *Drosophila*. Therefore I studied the expression of 101 genes, whose orthologues are expressed specifically in the heart of zebrafish. I identified a gene that encodes for the Cbl-associated protein (CAP). By generating an anti-CAP antibody I could describe the localization of the CAP protein in the heart for the first time in detail. Interestingly, it turned out that CAP is located similar to the homologous vertebrate proteins at the focal adhesion contacts of cardioblasts in the embryo and at the Z-discs and the cell-cell contact sites of cardiomyocytes in the adult heart. I also examined the consequences of the loss of CAP function on heart development. For the analysis of the *CAP* mutants I used immunohistochemical and ultrastructural analysis by TEM microscopy. So I was able to demonstrate that embryonic hearts of *CAP* mutants show a defective number and arrangement of cardioblasts and lumen defects. A genetic interaction test substantiated my guess that *CAP* interacts with the Integrin signaling pathway during embryonic heart development. Live recordings of the pumping heart of *Drosophila* L3 larvae and injection tests of late pupae also showed that the loss of CAP function leads to severe defects in the functionality of the larval and adult heart.

Keywords: dorsal vessel, heart lumen, Cbl-associated protein (CAP), Integrin

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	3
Abstract	4
Abkürzungsverzeichnis	9
Abbildungsverzeichnis	11
Tabellenverzeichnis	13
Vorwort	14
1 Einleitung	14
1.1 Die Morphologie und der zelluläre Aufbau des embryonalen Dorsalgefäßes von <i>Drosophila melanogaster</i>	14
1.2 Die Entwicklung des Dorsalgefäßes in <i>Drosophila melanogaster</i>	17
1.2.1 Mesodermbildung	17
1.2.2 Spezifizierung des dorsalen und kardialen Mesoderms	19
1.2.3 Spezifizierung der kardialen Zellen	21
1.3 Migration und Lumenbildung	23
1.3.1 Prozess der Herzschlauchbildung in <i>Drosophila</i>	23
1.3.2 Charakterisierung der verschiedenen Domänen der Kardioblastenmembran	23
1.3.3 Funktion der Robo/Slit- und Unc5/NetrinB-Signalwege während der Lumenbildung	25
1.3.4 Rolle von Zell-Matrix-Adhäsionen bei der Herzentwicklung in <i>Drosophila</i>	26
1.4 Anteroposteriore Organisation des Dorsalgefäßes	31
1.5 Umstrukturierungen vom larvalen zum adulten Dorsalgefäß	33
1.6 Adapterproteine der SoHo-Familie	35
1.7 Zielstellung der Arbeit	39
2 Materialien und Methoden	40
2.1 Materialien	40
2.1.1 Chemikalien	40
2.1.2 Verwendete Geräte	40
2.1.3 Enzyme und Reagenzienkits	41
2.1.4 Antikörper	42
2.1.5 Oligonukleotide	43
2.1.6 Fliegenstämme	43
2.2 Methoden	47
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	47
2.2.1.1 Isolation von genomischer DNA aus Fliegen	47

2.2.1.2	Isolation von genomischer RNA aus Fliegen	48
2.2.1.3	cDNA Synthese	48
2.2.1.4	Analyse der Qualität und Quantität der Nukleinsäuren	48
2.2.1.5	Sequenzierung	48
2.2.2	Biochemische Methoden	49
2.2.2.1	Herstellung eines CAP-Antikörpers	49
2.2.2.1.1	Klonierung des Expressionsvektors	49
2.2.2.1.2	Rekombinante Proteinexpression in <i>E. coli</i> BL21(DE) Zellen	49
2.2.2.1.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)	50
2.2.2.1.4	Coomassie-Färbung	51
2.2.2.1.5	Western Blot	51
2.2.2.1.6	Ni-NTA-Säulenaufreinigung	51
2.2.2.1.7	Dialyse	52
2.2.2.1.8	Affinitätsreinigung des CAP-Antikörpers	52
2.2.3	Arbeiten mit <i>Drosophila melanogaster</i>	53
2.2.3.1	Stammhaltung und Zucht	53
2.2.3.2	Embryonenablage auf Apfelsaftagarplatten	54
2.2.3.3	Ermittlung der Lebensdauer von adulten Fliegen	54
2.2.3.4	Injektionstest zur Ermittlung des kardialen Pumpvermögens nach (Drechsler et al., 2013)	54
2.2.3.5	Lebendbeobachtung Fluoreszenz-markierter L3-Larven zur Ermittlung der prozentualen systolischen Verkürzungsfraktion	55
2.2.4	Histologische Methoden	55
2.2.4.1	Formaldehydfixierung von Embryonen	55
2.2.4.2	Antikörper-Fluoreszenzfärbung von Embryonen	56
2.2.4.3	Signalverstärkung mit dem TSA™ Fluorescein System	56
2.2.4.4	<i>In situ</i> Hybridisierung von Embryonen nach (Wilk et al., 2010)	57
2.2.4.4.1	Herstellung von Digoxigenin-markierten RNA <i>in situ</i> Proben	57
2.2.4.4.2	Proteinase K Verdau und Prähybridisierung der Embryonen	58
2.2.4.4.3	Hybridisierung der Embryonen mit den RNA-Sonden	58
2.2.4.4.4	Detektion der RNA-Sonden	59
2.2.4.5	Präparation und Färbung von adulten Dorsalgefäßen	59
2.2.4.6	Präparation und Färbung von larvalen Dorsalgefäßen	60
2.2.4.7	Histologische Schnitte und Elektronenmikroskopie	60
2.2.5	Mikroskopie	61
3	Ergebnisse	62
3.1	Kandidaten <i>in situ</i> Screen zur Identifizierung neuer an der Herzentwicklung in <i>Drosophila melanogaster</i> beteiligter Gene	62
3.1.1	Auswahl der Kandidatengene für den <i>in situ</i> Screen	62

3.1.2 Zusammenfassung der <i>in situ</i> Screen Ergebnisse	62
3.2 CAP spielt eine wichtige Rolle in der Herzentwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i>	70
3.2.1 CAP wird in dem embryonalen Dorsalgefäß exprimiert	70
3.2.2 Das CAP-Protein ist spezifisch im Dorsalgefäß lokalisiert	72
3.2.3 Der Verlust der CAP Funktion führt zu einer anomalen Anzahl und zu Anordnungsdefekten der Kardioblasten	76
3.2.4 CAP ist essentiell für die Herzlumenbildung	79
3.2.5 Die Polarität der Kardioblastenmembran an der luminalen Domäne ist in CAP-Mutanten unverändert	82
3.2.6 CAP interagiert mit Komponenten des Integrin-Signalwegs während der Herzentwicklung	85
3.2.7 CAP mutante Fliegen weisen Defekte in der Herzfunktion auf	87
3.2.8 CAP mutante Fliegen haben eine verkürzte Lebensdauer	90
3.2.9 CAP ist im adulten Dorsalgefäß an den Zell-Zell-Kontaktstellen und den Z-Scheiben der Sarkomere lokalisiert	93
3.2.10 Das adulte Dorsalgefäß von CAP-Mutanten weist fehlangeordnete Kardiomyozyten und Veränderungen in der Anordnung der Myofibrillen auf	95
4 Diskussion	97
4.1 Der <i>in situ</i> Screen identifizierte neue Gene, die im embryonalen Dorsalgefäß von <i>Drosophila</i> exprimiert sind	97
4.2 CAP ist wichtig für die Entwicklung und Funktion des Dorsalgefäßes	100
4.2.1 Das <i>Drosophila</i> CAP und die Vertebraten SOHO-Proteine sind im Herzen exprimiert	100
4.2.1.1 Vergleich der Expression von dem <i>Drosophila</i> CAP und den Vertebraten SORBS Genen	100
4.2.1.2 Das <i>Drosophila</i> CAP Protein ist wie die SoHo-Proteine im Herzen lokalisiert	102
4.2.2 Mögliche Rolle von CAP und Integrinen während der embryonalen Herzentwicklung	104
4.2.2.1 CAP-Mutanten weisen ähnliche Defekte des embryonalen Dorsalgefäßes auf wie Integrinmutanten	104
4.2.2.1.1 CAP als Regulator der Zellproliferation und Zelladhäsion: mögliche Ursachen für die Anordnungsdefekte und die erhöhte Zahl der Kardioblasten	104
4.2.2.1.2 CAP als Verbindung zwischen Aktinzytoskelett und der Extrazellulären Matrix: mögliche Ursachen für die beobachteten Lumendefekte	108
4.2.3 CAP ist wichtig für die Ausbildung eines funktionalen Herzsyzytiums	110

5 Ausblick.....	112
6 Literaturverzeichnis	114
Anhang.....	131
Danksagung.....	140
Wissenschaftliche Beiträge	141
Eidestättliche Erklärung	142

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. bidest</i>	bidestilliertes Wasser
mA, A	Milliampere, Ampere
Amp	Ampicillin
APF	<i>after pupae formation</i> (nach Verpuppung)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
°C	Grad Celsius
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
C-terminal	Carboxy-terminal
Df	Defizienz
Dig	Digoxigenin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	(Desoxy)Nukleosidtriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
ng, µg, mg, g	Nanogramm, Mikrogramm, Milligramm, Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
h	Stunden
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galaktosid
kDa	Kilodalton
kPa	Kilopascal
µl, ml, l	Mikroliter, Milliliter, Liter
µM, mM, M	Mikromolar, Millimolar, Molar
min	Minuten

mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-RNA)
NBT	Nitro blue tetrazolium
nm, μm	Nanometer, Mikrometer
N-terminal	Amino-terminal
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
pmol	pikomol
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuklease
R.O.I.	<i>Region of Interest</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
ms, s	Millisekunden, Sekunden
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TRITC	Tetramethylrhodamine
TEMED	NNN'N' Tetramethyl-ethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer RNA
U	Unit
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung des embryonalen Dorsalgefäßes von <i>Drosophila</i>	15
Abbildung 2 Übersicht des transkriptionellen Netzwerks der Herzentwicklung in <i>Drosophila</i>	21
Abbildung 3 Lumenbildung des Dorsalgefäßes	24
Abbildung 4 Vereinfachte Darstellung von Integrinrezeptoren, die die Extrazelluläre Matrix (EZM) mit dem Aktinzytoskelett verbinden.	28
Abbildung 5 Schematische Übersicht der Expressionsmuster segmentaler Regulatoren (A) und der Hox-Gene (B).	32
Abbildung 6 Schematische Darstellung der Proteinstrukturen von <i>Drosophila</i> CAP und den Vertebraten SoHo-Proteinen.	37
Abbildung 7 Expression der im Dorsalgefäß exprimierten Kandidatengene.	68
Abbildung 8 Karte der genomischen Region von <i>CAP</i>	71
Abbildung 9 Expression von <i>CAP</i> während der Embryogenese.	72
Abbildung 10 Kodierende Sequenzen der CAP-Isoformen	73
Abbildung 11 CAP-Antikörper	74
Abbildung 12 CAP ist im Dorsalgefäß lokalisiert.	75
Abbildung 13 <i>CAP</i> -Mutanten weisen Defekte in der Anzahl und in der Anordnung der Kardioblasten auf.	78
Abbildung 14 CAP ist wichtig für die Herzlumenbildung.	80
Abbildung 15 Die basale Membran der luminalen Domäne des Dorsalgefäßes ist in <i>CAP</i> -Mutanten vorhanden.	81

Abbildung 16 Die Verteilung der luminalen Marker Slit und β PS1 Integrin ist diffuser in <i>CAP</i> -Mutanten als im Wildtyp.....	83
Abbildung 17 Slit und β PS1 Integrin Verteilung in <i>CAP</i> -Mutanten.	84
Abbildung 18 Ko-Expression von <i>CAP</i> und β PS1 Integrin im Embryonalstadium 14.....	85
Abbildung 19 <i>CAP</i> interagiert mit <i>scb</i> und <i>rhea</i> während der Entwicklung des Dorsalgefäßes.....	86
Abbildung 20 <i>CAP</i> ist wichtig für eine normale Herzfunktionalität.	88
Abbildung 21 Der Verlust von <i>CAP</i> führt zu einer Reduzierung des kardialen Pumpvermögens.	89
Abbildung 22 Western Blot zur Ermittlung der RNAi-Effizienz der verschiedenen <i>UAS-CAP-RNAi</i> -Linien bei 25 °C und 29 °C.....	91
Abbildung 23 Lebensdauer von <i>CAP</i> -Mutanten und einer <i>CAP-RNAi</i> -Linie im Vergleich zum Wildtyp.	92
Abbildung 24 <i>CAP</i> ist im larvalen und adulten Dorsalgefäß exprimiert.	93
Abbildung 25 <i>CAP</i> lokalisiert im adulten Dorsalgefäß von <i>Drosophila</i> an den Zell-Zell-Kontaktstellen und den Z-Scheiben.	94
Abbildung 26 Fehlangeordnete Kardiomyozyten führen in <i>CAP</i> -Mutanten zu Defekten der Verlaufsrichtung der zirkulären Myofibrillen.	96
Abbildung 27 Überlappung der <i>in situ</i> Kandidatengene mit dem Proteom des adulten Dorsalgefäßes und dem Transkriptom der adulten Herzmorphogenese.	99

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht über die SoHo-Proteinfamilie in Vertebraten.....	36
Tabelle 2 Verwendete Geräte	40
Tabelle 3 Enzyme.....	41
Tabelle 4 Reagenzienkits.....	41
Tabelle 5 Primäre Antikörper	42
Tabelle 6 Sekundäre Antikörper.....	43
Tabelle 7 Reporterstämme	44
Tabelle 8 Balancerstämme	44
Tabelle 9 Defizienzlinie	45
Tabelle 10 Mutanten	45
Tabelle 11 UAS-und Gal4-Linien.....	45
Tabelle 12 Zusammensetzung der SDS-Gele.....	50
Tabelle 13 Reaktionsansatz <i>in vitro</i> Transkription	57
Tabelle 14 Darstellung der 101 Kandidatengene des <i>in situ</i> Screens	63
Tabelle 15 Übersicht der 20 Gene, die im embryonalen Dorsalgefäß exprimiert werden	64
Tabelle 16 Quantifizierung des CAP Herzphänotyps	77
Tabelle 17 Verwendete Oligonukleotide für den <i>in situ</i> Screen	131
Tabelle 18 Übersicht der Expressionsdaten des <i>in situ</i> Screens.....	136

Vorwort

Ein zentrales Ziel der Entwicklungsbiologie ist die Identifizierung und Charakterisierung von Genen, die die Bildung von spezifischen Zelltypen, Geweben und Organen kontrollieren. Das Herz ist eines der ersten Organe, die während der Embryogenese gebildet werden und seine zirkulatorische Funktion ist bereits in Vertebratenembryonen für die Lebensfähigkeit von entscheidender Bedeutung. Defekte in der Herzentwicklung führen oft zu angeborenen Herzerkrankungen, die den häufigsten Geburtsdefekt bei Neugeborenen darstellen (Bier und Bodmer, 2004). Um diese zum Teil genetisch bedingten Herzerkrankungen besser verstehen zu können, ist es von großer Bedeutung, die molekularen Grundlagen und insbesondere die an der Herzentwicklung beteiligten Gene zu identifizieren. Das Dorsalgefäß von *Drosophila melanogaster* stellt dafür ein geeignetes Modellsystem dar. Neben der einfachen und kostengünstigen Haltung, der schnellen Generationszeit sowie der sehr guten genetischen Manipulierbarkeit, ist das röhrenförmige Dorsalgefäß von *Drosophila* im Vergleich zum Vertebratenherz sehr einfach aufgebaut. Zudem weisen die Kardioblasten des Dorsalgefäßes interessanterweise sowohl endotheliale als auch myokardiale Charakteristika auf. Dabei sind die genetischen und molekularen Mechanismen der frühen Herzentwicklung (Ausbildung des primitiven Herzschauchs) von *Drosophila* bis zu den Vertebraten sehr konserviert, wobei die Analyse in *Drosophila* aufgrund der geringeren genetischen Redundanz erleichtert wird (Bodmer, 2004; Bodmer und Venkatesh, 1998; Rugendorff et al., 1994; Zaffran et al., 2002).

1 Einleitung

1.1 Die Morphologie und der zelluläre Aufbau des embryonalen Dorsalgefäßes von *Drosophila melanogaster*

Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* verfügt über ein offenes Kreislaufsystem. Das röhrenförmige Dorsalgefäß pumpt die sogenannte Hämolymphe und sorgt damit für die Verteilung von Hämozyten und Nährstoffen sowie für die Entsorgung von Abfallprodukten. Anders als in Vertebraten befindet sich das Dorsalgefäß von *Drosophila* dorsal der Mittellinie und wird aufgrund dieser Lokalisation und seiner tubulären Struktur auch als „*dorsal vessel*“ bezeichnet. Das embryonale Dorsalgefäß erstreckt sich über die letzten beiden thorakalen Segmente T2 – T3 und die

Abdominalsegmente A1 – A8. Zudem ist das Dorsalgefäß über sieben Paar synzytiale Alarmuskeln an den Intersegmentalgrenzen der Körperwand befestigt (Rizki, 1978).

Morphologisch und funktional gliedert sich das embryonale Dorsalgefäß in zwei Bereiche. Der anteriore Bereich des Dorsalgefäßes wird als Aorta bezeichnet und mündet in die Ausströmöffnung für die Hämolymphe. Der posteriore Bereich umfasst das Herz, das auch als Ventrikel bezeichnet wird. Das Herz verfügt nicht nur über ein größeres Lumen, sondern beinhaltet auch die Einströmöffnungen (Ostia) für die Hämolymphe (Gajewski et al., 2000; Molina und Cripps, 2001).

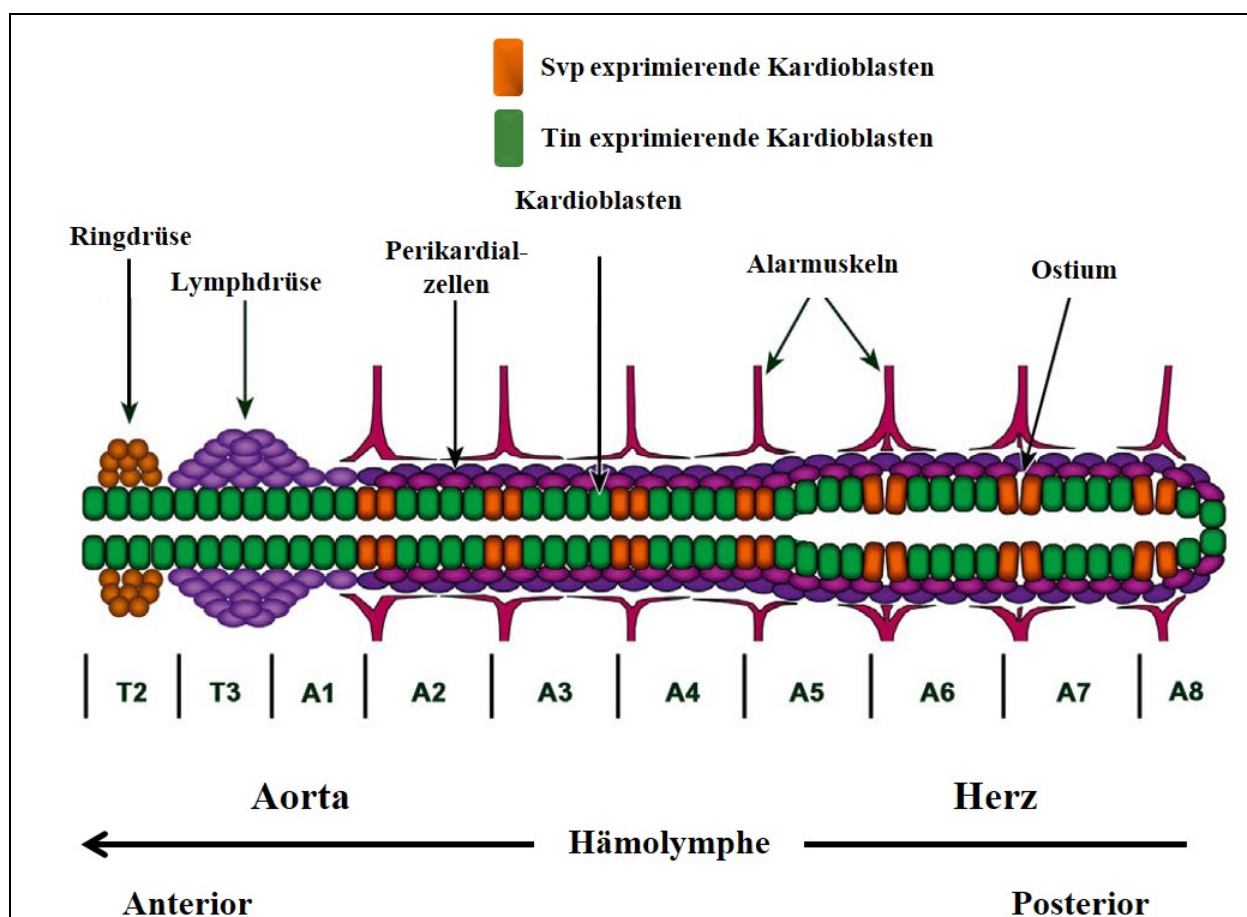


Abbildung 1 Schematische Darstellung des embryonalen Dorsalgefäßes von *Drosophila*

Das Dorsalgefäß wird von 104 kontraktilen Kardioblasten und nichtkontraktilen Perikardialzellen gebildet. Dabei unterscheidet man bei den Kardioblasten zwischen Tinman (Tin) und Seven up (Svp) exprimierenden Zellen. Ein Hemisegment umfasst dabei zwei Seven up und vier Tinman exprimierende Kardioblasten. Im posterioren Herz bilden die Seven up positiven Kardioblasten Einströmöffnungen für die Hämolymphe, die sogenannten Ostia. Die Hämolymphe gelangt über die Ostia in das Herz und wird durch die Aorta in den anterioren Bereich der Fliege gepumpt. Es befinden sich zudem zwei assoziierte Drüsen im Aortabereich: die Ringdrüse und die Lymphdrüse. Modifiziert nach Bodmer und Frasch, 2010.

Wie der Abbildung 1 zu entnehmen ist, wird das Dorsalgefäß von zwei Zelltypen gebildet: den Kardioblasten und den Perikardialzellen. Die 104 Kardioblasten sind in zwei Reihen angeordnet und bilden zwischen sich ein durchgehendes Lumen aus, durch das die Hämolymphe gepumpt wird (Haag et al., 1999; Rizki, 1978; Rugendorff et al., 1994). Die Kardioblasten sind kontraktile und exprimieren muskelspezifische Proteine wie Aktin, Tropomyosin, MHC/MLC und β -Tubulin sowie muskelspezifische Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise Mef2. Man unterteilt die Kardioblasten in Tinman exprimierende Kardioblasten, die vor allem für die Kontraktionen des Dorsalgefäßes wichtig sind und Seven up exprimierende Kardioblasten, die die Einstromöffnungen bilden (Bodmer und Frasch, 2010).

Umgeben sind die Kardioblasten von nichtkontraktilen Perikardialzellen. Von diesem Zelltyp existieren vereinfacht dargestellt zwei verschiedene Populationen. Die eine Perikardialzellpopulation exprimiert das Gen *odd-skipped*, während die andere Population durch die Expression der Gene *even-skipped*, *tinman* und *ladybird* charakterisiert ist (Alvarez et al., 2003; Han und Bodmer, 2003; Ward und Skeath, 2000). Embryonal verfügt das Dorsalgefäß über 144 Perikardialzellen, deren genaue Funktion bisher nicht geklärt ist. Für einige Perikardialzellen ist eine Funktion ab den larvalen Entwicklungsstadien bekannt. So differenzieren die im posterioren Bereich des Dorsalgefäßes lokalisierten Perikardialzellen zu Nephrozyten und filtern Toxine und Abfallstoffe aus der Hämolymphe (Das et al., 2008; Weavers et al., 2009).

Even-skipped exprimierende Perikardialzellen entwickeln sich im thorakalen Bereich zu adulten Flügelherzen (zusätzliche pulsierende Organe der Flügel) (Tögel et al., 2008).

Zudem bilden Odd-skipped exprimierende Perikardialzellen im Bereich der Aorta die sogenannte Lymphdrüse, die im larvalen und adulten Entwicklungsstadium als blutbildendes Organ fungiert (Holz et al., 2003; Mandal et al., 2004; Rizki, 1978). Anterior der Lymphdrüse befindet sich eine neuroendokrine Drüse, die durch Fusion der drei Organe *Corpora Cardiac*a, *Corpora Allata* und der Prothoraxdrüse entsteht und als Ringdrüse bezeichnet wird. In der Ringdrüse werden unter anderem das Steroidhormon Ecdyson und das Juvenilhormon produziert. (De Velasco et al., 2004; Harvie et al., 1998).

1.2 Die Entwicklung des Dorsalgefäßes in *Drosophila melanogaster*

1.2.1 Mesodermbildung

Das röhrenförmige Dorsalgefäß von *Drosophila* entwickelt sich wie in Vertebraten aus dem Mesoderm. Die Mesodermbildung in *Drosophila* wird initiiert durch einen nuklearen Gradienten des Proteins Dorsal. Dorsal ist ein NFκB-verwandtes Morphogen, das bereits maternal im Blastodermembryo vorliegt und dessen nukleare Konzentration graduell von ventral nach dorsal abnimmt (Rusch und Levine, 1996). Im ventralen Bereich des Embryos, wo die Konzentration des Proteins Dorsal in den Zellkernen am größten ist, bindet Dorsal direkt an den Promotor des Gens *twist* und aktiviert dessen Expression (Jiang et al., 1991; Pan et al., 1991; Thisse et al., 1991). *Twist* kodiert für einen Transkriptionsfaktor der basischen Helix-Schleifen-Helix (bHLH) Proteinfamilie und aktiviert wiederum zusammen mit Dorsal die Expression von *snail*, einem Transkriptionsfaktor der Zinkfingerproteinfamilie (Boulay et al., 1987). Während Twist die Expression weiterer mesodermaler Gene wie *folded gastrulation* und für die Herzentwicklung wichtiger Gene wie *heartless*, *tinman*, *mef2*, *zfh-1* und *mir-1* aktiviert, wurde für Snail im allgemeinen eine reprimierende Wirkung auf die Transkription von nicht-mesodermalen Genen wie beispielsweise *short gastrulation* und des FGF homologen Gens *thisbe* beschrieben (Kosman et al., 1991; Leptin, 1991). Neuste Studien weisen jedoch darauf hin, dass Snail als dualer Transkriptionsfaktor wirkt. So konnten Rembold et al. (2014) zeigen, dass in *snail*-Mutanten zwar keine Mesodermdifferentenzierung stattfindet, die Invagination der ventralen Furche jedoch erfolgt. Zudem zeigten weitere Analysen dieser Studie, dass die Expression vieler mesodermaler und für die Herzentwicklung wichtiger Gene wie *mef2*, *tin*, *htl*, *zfh-1* reduziert ist (Rembold et al., 2014). Einen weiteren Hinweis auf die duale Rolle von Snail zeigten Experimente, bei denen die Mesodermentwicklung in hypomorphen *twist*-Mutanten durch Überexpression von Snail gerettet werden konnte (Wong et al., 2014). Kommt es jedoch zu einem Funktionsverlust einer dieser beiden Transkriptionsfaktoren, findet die Gastrulationsinitiation und die weitere Mesodermdifferentenzierung nicht statt (Leptin und Grunewald, 1990; Simpson, 1983; Thisse et al., 1987).

Im Vergleich zu dem ventralen Bereich des Embryos ist die Konzentration von Dorsal in den Zellkernen der lateralen Regionen geringer. Daraus resultierend kommt es in diesem Bereich zur Aktivierung von neuroektodermalen Genen wie *short gastrulation*

und *thisbe*, da die Enhancer dieser Gene eine höhere Affinität zu Dorsal aufweisen als die Enhancer von *twist* und *snail*. Der laterale Bereich des Embryos entwickelt sich zum Neuroektoderm. Der dorsale Bereich des Embryos weist kein Dorsal im Zellkern auf, so dass ektodermale Gene wie *zen* und *dpp* exprimiert werden (Markstein et al., 2002; Stathopoulos und Levine, 2004).

Doch inwiefern ist die Ausbildung dieser drei Bereiche entlang der dorso-ventralen Körperachse des Embryos entscheidend für die Herzentwicklung?

Betrachtet man die Mesodermbildung, so kommt es im Embryonalstadium 6/7 zu einer Invagination der ventralen Zellen des Embryos. Nicht einmal eine halbe Stunde später flachen sich diese Zellen ab und breiten sich in dorsaler Richtung aus. Dabei kommt es zu Ausbildung des Keimbandes. Im Embryonalstadium 9 ist das Keimband vollständig gestreckt und die mesodermalen Zellen haben die dorsale Grenze des Ektoderms erreicht (Bate und Arias, 1993). Die mesodermalen Zellen, die sich am nächsten zu der dorsalen Ektodermgrenze befinden, erhalten induktive Dpp-Signale, die für die weitere dorsale Mesodermspezifizierung entscheidend sind (Frasch, 1995).

Für die Ausbreitung und die dorsale Migration der mesodermalen Zellen ist der FGF-Signalweg von essentieller Bedeutung. Wie bereits erwähnt wird die Expression des für die Herzentwicklung wichtigen FGF-Rezeptors *Heartless* durch den Transkriptionsfaktor *Twist* im ventralen Bereich des Embryos induziert. Dahingegen werden die beiden FGF-Liganden *Thisbe* und *Pyramus* nicht wie der Rezeptor im ventralen, sondern im lateralen, neuroektodermalen Bereich des Embryos exprimiert. Schaltet man die Gene, die für *Heartless* oder beide Liganden kodieren aus, so unterbleibt die Ausbreitung und dorsale Migration der mesodermalen Zellen. In den Mutanten wird weder die viszerale Muskulatur noch das Dorsalgefäß oder die dorsale somatische Muskulatur ausgebildet. Dieser Phänotyp beruht darauf, dass zu wenige mesodermale Zellen in Bereiche des ektodermalen Dpp-Signals kommen, um die weitere Mesodermspezifizierung zu induzieren. Interessanterweise konnte durch die ektopische Expression von Dpp in lateralen Bereichen der *heartless*-Mutanten die Bildung der Gewebe zumindest teilweise wiederhergestellt werden (Beiman et al., 1996; Gisselbrecht et al., 1996; Stathopoulos et al., 2004).

1.2.2 Spezifizierung des dorsalen und kardialen Mesoderms

Mit dem Erreichen der induktiven Signale aus dem Ektoderm beginnt die weitere Spezifizierung der mesodermalen Zellen. Man unterscheidet drei verschiedene Gruppen von Genen, die für die weitere Spezifizierung entscheidend sind. Die erste Gruppe von Genen, die die Gene *dpp* und *tinman* umfasst, ist für die dorsoventrale Differenzierung des Mesoderms verantwortlich. *Tinman* kodiert für einen Transkriptionsfaktor aus der Klasse der NK-Homöobox-Gene. Tinman und dessen Vertebratenhomolog Nkx2-5 sind von außerordentlicher Bedeutung für die Herzentwicklung. So führt in Vertebraten ein Fehlen von Nkx2-5 zur Arretierung der Herzentwicklung nach Ausbildung des linearen Herzrohres. In *Drosophila* unterbleibt die gesamte Kardiogenese in *tinman*-Mutanten (Azpiazu und Frasch, 1993; Bodmer, 1993; Lyons et al., 1995). *Tinman*, das zu Beginn der Gastrulation noch sehr breit in allen mesodermalen Zellen exprimiert ist, wird im Embryonalstadium 10 durch Dpp auf die lateralen Mesodermbereiche, die sich zum dorsalen Mesoderm entwickeln, begrenzt (Azpiazu und Frasch, 1993; Bodmer, 1993). Dieser Wechsel der *tinman* Expression ist vor allem auf eine veränderte Nutzung der *tinman* Enhancer zurückzuführen. Dabei führt die Bindung von ektodermal produzierten Dpp an seine Rezeptoren Thickvein und Punt zu der Phosphorylierung des SMAD Proteins MAD in den dorsalen Mesodermzellen. Phosphoryliertes und damit aktiviertes MAD-Protein bildet daraufhin mit dem weiteren SMAD Protein Medea Heterooligomere. Diese SMAD-Proteinkomplexe translokalisieren in den Zellkern der Mesodermzellen, wo sie an den *tinD* Enhancer binden und die *tinman* Expression in den dorsalen Mesodermzellen aufrechterhalten. Interessanterweise ist für die Aktivierung des *tinD* Enhancers durch den SMAD-Proteinkomplex die Bindung von bereits vorhandenem Tinman an den *tinD* Enhancer essentiell (Xu et al., 1998; Yin et al., 1997). Durch diesen autoregulatorischen Mechanismus wird das kardiale Feld auf die mesodermalen Zellen begrenzt.

Eine weitere wichtige Funktion von Dpp während dieser frühen Phase der Herzentwicklung ist die Induktion der Expression der drei T-Box Gene *Dorsocross 1-3* (*Doc1-3*) und des Gens *tailup* (*tup*) innerhalb des dorsalen Mesoderms (Reim und Frasch, 2005; Tao et al., 2007). Zudem scheint auch die Expression des GATA-Faktor Pannier, die durch Tinman und Dorsocross aktiviert wird, Dpp-Signale zu benötigen (Abbildung 2; Gajewski et al., 2001; Klinedinst und Bodmer, 2003). So führen ektodermale Dpp-Signale und die dorsale Begrenzung der

tinman Expression zu einer ersten Unterteilung des Mesoderms in einen dorsalen und ventralen Bereich. Aus dem dorsalen Mesoderm gehen neben dem Dorsalgefäß, auch die viszerale Muskulatur und die dorsale somatische Muskulatur hervor. Die Bedeutung der ektodermalen Dpp-Signale zeigen auch Untersuchungen an *dpp*-Mutanten. So verschwindet in *dpp* mutanten Embryonen die *tinman* Expression kurz nach der Gastrulation und die Ausbildung des kardialen Mesoderms, des viszeralen Mesoderms und der dorsalen somatischen Muskeln unterbleibt (Frasch, 1995; Yin und Frasch, 1998; Zaffran und Frasch, 2002).

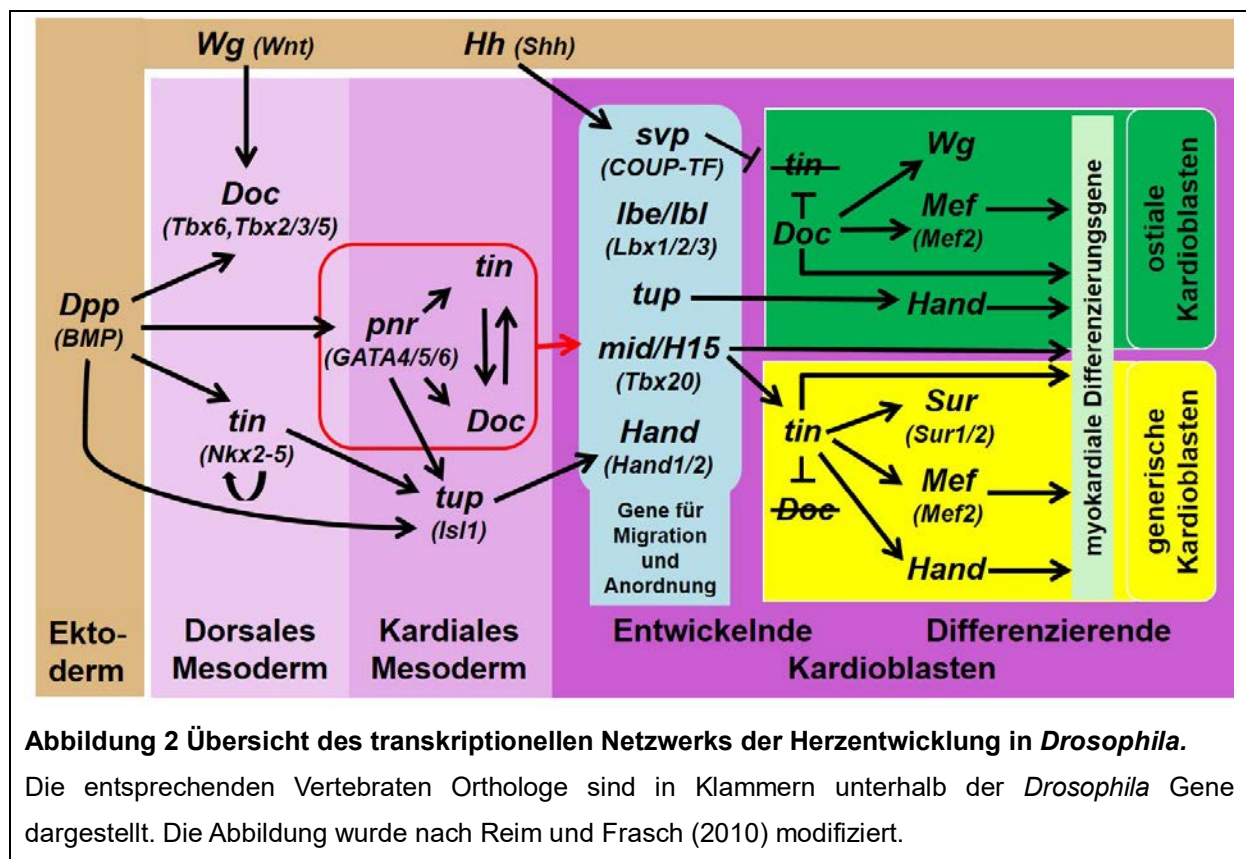
Durch die zweite Gruppe von Genen, die vor allem *wingless* (*wg*) und die Wingless-Zielgene *sloppy paired* (*slp*) 1 und 2 umfasst, erfolgt die anteroposteriore Unterteilung des dorsalen Mesoderms in segmentale Gruppen. Das *Drosophila* Homolog des Maus Oncoproteins Wnt-1, Wingless, wird in 15 Längsstreifen exprimiert und spielt eine zentrale Rolle in der anteroposterioren Segmentpolarität des Ektoderms (Baker, 1987). *Wingless*-Mutanten fehlt das Dorsalgefäß und die kardialen Vorläuferzellen, während die viszerale und die somatische Muskulatur fehlerhaft ausgebildet werden (Azpiazu et al., 1996; Baylies et al., 1995; Ranganayakulu et al., 1996). Wingless ist zusammen mit Dpp entscheidend für die weitere Unterteilung des dorsalen Mesoderms und für die Ausbildung eines kardialen Zellschicksals (Lee und Frasch, 2000; Lockwood und Bodmer, 2002; Park et al., 1996; Riechmann et al., 1997; Wu et al., 1995).

Dabei spielen auch die Wingless-Zielgene *sloppy paired* 1 und 2 eine wichtige Rolle (Riechmann et al., 1997). Die *slp* Gene kodieren für *forkhead*-Domänen Repressoren und werden wie *wg* in den mesodermalen und ektodermalen Streifen exprimiert (Lee und Frasch, 2000). Dabei verhindert die Slp Expression im Mesoderm die Induktion der viszeralen Mesoderm-Regulatoren Binou und Bagpipe durch Dpp und Tinman (Lee und Frasch, 2000; Riechmann et al., 1997). So zeigten Lee und Frasch (2000), dass Wingless nur in der Lage ist die Expression anderer kardialer Regulatoren zu induzieren, wenn eine Blockierung der Expression viszeraler Mesoderm-Regulatoren durch Slp erfolgt. Zudem reguliert Slp die Expression von *twist* in einem gestreiften Muster innerhalb des lateralen und ventralen Mesoderms hoch und steuert damit die Ausbildung der somatischen Muskulatur (Baylies und Bate, 1996; Riechmann et al., 1997).

Die dritte Gruppe umfasst die Gene *Dorsocross*, *pannier* und *tailup*. Diese Gene unterstützen die Entwicklung des kardialen Gewebes in der Region, in der es zur

Überlappung der Dpp- und Wg-Signale kommt. Dahingegen kommt es zur Spezifizierung des viszeralen Mesoderms in den Bereichen, in denen *binou* und *bagpipe* exprimiert werden (Azpiazu und Frasch, 1993; Gajewski et al., 1999; Klinedinst und Bodmer, 2003; Mann et al., 2009; Reim und Frasch, 2005).

Die kombinierte Expression von Dorsocross, Pannier und Tailup führt zur Aktivierung weiterer Gene wie *mid/nmr2*, *Hand*, *ladybird*, *even-skipped*, *seven up* in allen oder nur einigen der kardialen Vorläuferzellen (Abbildung 2; Bodmer und Frasch, 2010; Reim und Frasch, 2010).



1.2.3 Spezifizierung der kardialen Zellen

Die Spezifizierung der kardialen Zellen aus dem kardialen Mesoderm ist ein mehrstufiger Prozess, der zur Ausbildung von Kardioblasten, Perikardialzellen und einem Teil der dorsalen Körpermuskulatur führt. Im Embryonalstadium 11 entstehen innerhalb der Tinman/Dorsocross/Pannier exprimierenden, kardialen Mesodermregion verschiedene Zellcluster (Äquivalenzgruppen) kardialer Vorläuferzellen. Die Gruppen der gebildeten kardialen Vorläuferzellen unterscheiden sich durch die Expression der Gene *even-skipped* (*eve*), *ladybird early* (*lbe*), *seven up* (*svp*), *odd-skipped* (*odd*) und *tinman* (Han et al., 2002; Jagla et al., 2002; Ward

und Skeath, 2000). Für die anteroposteriore Anordnung der Zellcluster spielt das Segmentpolaritätsgen Hedgehog (Hh) eine entscheidende Rolle (Liu et al., 2006; Ponzielli et al., 2002).

Innerhalb der kardialen Zellcluster kommt es durch laterale Inhibition zur Determinierung und Differenzierung einer Vorläuferzelle. Dabei wird zunächst innerhalb der Zellcluster die Expression des Notch-Liganden Delta induziert (Carmena et al., 2002). Delta wiederum bindet an die Notch-Rezeptoren benachbarter Zellen und aktiviert dort den Notch-Signalweg. Dies führt zu einer Suppression des RKT/Ras-Signalwegs und gleichzeitig zu einer weiteren Aktivierung des Notch-Signalwegs in diesen Zellen. Die Zelle eines Zellclusters, die mehr Moleküle des Notch-Liganden Delta auf ihrer Oberfläche exprimiert als die Nachbarzellen, wird als Vorläuferzelle determiniert (Lai, 2004; Schweisguth, 2004). Die ausgewählten Vorläuferzellen werden durch symmetrische bzw. asymmetrische Zellteilungen weiter differenziert. Die asymmetrischen Zellteilungen erfolgen dabei wiederum in Abhängigkeit des Notch-Signalweges. Die sich asymmetrisch teilenden Vorläuferzellen exprimieren den intrazellulären Notch-Inhibitor Numb. Numb ist dabei asymmetrisch innerhalb der Vorläuferzelle verteilt, so dass aus der Zellteilung eine Numb positive Tochterzelle (Kardioblast) und eine Numb negative Tochterzelle (Perikardialzelle) hervorgehen (Ward und Skeath, 2000). Die *Even-skipped* exprimierenden Vorläuferzellen teilen sich zu zwei Perikardialzellen und zwei dorsalen Muskeln pro Hemisegment. Aus den *Ladybird* und *Seven up* exprimierenden Vorläufern entwickeln sich jeweils zwei Kardioblasten und zwei Perikardialzellen pro Hemisegment. Die *ladybird* und *seven up* positiven Kardioblasten exprimieren dabei zusätzlich *tinman*. Neben den beschriebenen asymmetrischen Zellteilungen, finden auch symmetrische Zellteilungen von weiteren Vorläuferzellen statt. *Tinman* Vorläuferzellen, die weder *seven up* noch *ladybird* exprimieren, differenzieren zu zwei *Tinman* exprimierenden Kardioblasten pro Hemisegment und *Odd-skipped* exprimierende Vorläuferzellen teilen sich zu zwei Perikardialzellen (Alvarez et al., 2003; Han und Bodmer, 2003; Ward und Skeath, 2000).

1.3 Migration und Lumenbildung

1.3.1 Prozess der Herzschauchbildung in *Drosophila*

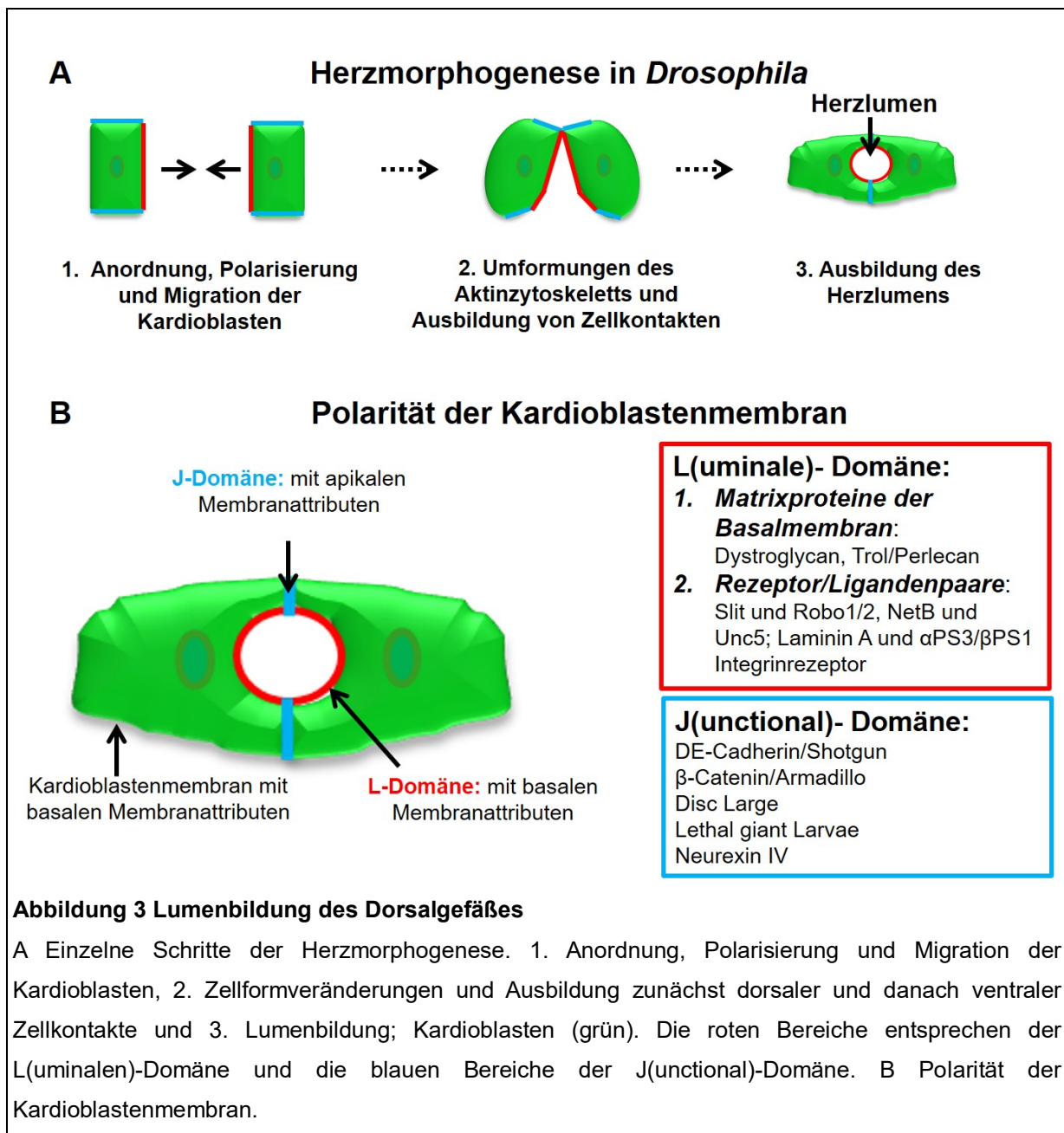
Während des Embryonalstadiums 12 reihen sich die spezifizierenden Kardioblasten zunächst in bilateralen Reihen auf jeder Seite des Embryos auf und migrieren mit den angrenzenden Perikardialzellen hinter den ektodermalen Epidermiszellen in Richtung der dorsalen Mittellinie aufeinander zu. Zu Beginn der Migration weisen die Kardioblasten eine noch kuboidale Zellform auf. Bald darauf kommt es zu ersten Zellformveränderungen. Die Kardioblasten schnüren sich dorsal ein, wodurch die Zellen eine Birnen-ähnliche Form erhalten. An der dadurch gebildeten dorsalen *Leading edge* bilden sich Aktin-reiche Ausstülpungen aus (Medioni et al., 2008; Rugendorff et al., 1994).

Noch vor dem Ende der Migrationsphase werden die mesenchymalen Zellen polarisiert (Mesenchym-Epithel Übergang; Frémion et al., 1999). Die beiden Kardioblastenreihen treffen einander an der dorsalen Mittellinie und bilden zunächst dorsale Zellkontakte aus. Nach weiteren Umorganisationen des Aktinzytoskeletts und daraus resultierenden Zellformveränderungen von einer Birnen-ähnlichen in eine Sichel-ähnliche Form, kommen auch die ventralen Bereiche der kontralateralen Kardioblasten in räumliche Nähe, so dass auch dort Zellkontakte ausgebildet werden. Parallel zur Ausbildung der Zellkontakte wird innerhalb der luminalen Region extrazelluläre Matrix sezerniert und die Lumenbildung eingeleitet. Mit Abschluss der Herzmorphogenese bilden jeweils zwei kontralaterale Kardioblasten ein Lumen aus (Abbildung 3A; Haag et al., 1999; Medioni et al., 2008; Rugendorff et al., 1994). Aufgrund von Kontraktionsbewegungen der Kardioblasten wird durch dieses Lumen Hämolymphe gepumpt, wodurch Nährstoffe und Immunzellen innerhalb des Organismus verteilt werden.

1.3.2 Charakterisierung der verschiedenen Domänen der Kardioblastenmembran

Bei dem Dorsalgefäß von *Drosophila* handelt es sich um ein sekundäres Epithel, das durch eine Mesenchym-Epithel Transition am Ende der Migrationsphase der Kardioblasten gebildet wird. Bei der Mesenchym-Epithel Transition kommt es zur Reorganisation der Plasmamembran der mesenchymalen Kardioblasten, die zu einer

Polarisierung der Kardioblastenmembran und der Ausbildung von Zellverbindungen führt (Abbildung 3A; Frémion et al., 1999; Medioni et al., 2008).



Die Kardioblasten bilden jedoch keine typische epitheliale Polarität aus. Vielmehr resultiert die Polarisierung der Kardioblasten in einer Kompartimentierung der Zellmembran in luminale und abluminale Domänen. Die dem Lumen zugewandte Membranseite der Kardioblasten gliedert sich zudem in die J(unctional)-Domänen und die L(uminal)-Domäne (Medioni et al., 2008).

Als J(unctional)-Domänen werden die dorsalen und ventralen Membranregionen, die die Zellkontakte zwischen den kontralateralen Kardioblasten ausbilden, bezeichnet

(Abbildung 3B; blaue Region). Diese Membranbereiche sind durch Adhäsionsverbindungen (*adherens junctions*) und die Expression von Adhäsionsproteinen wie beispielsweise β -Catenin/Armadillo und DE Cadherin/Shotgun charakterisiert (Frémion et al., 1999; Haag et al., 1999; Medioni et al., 2008).

Die als L(uminal)-Domäne bezeichnete Kardioblastenmembran umschließt das Herzlumen (Abbildung 3B; rote Region). Betrachtet man die Membranattribute der L-Domäne, so wird der erwähnte besondere Polaritätszustand der Kardioblastenmembran deutlich, da typische apikale Membranmarker wie Crumbs und β H-Spectrin nicht an der luminalen Membrandomäne exprimiert werden (Medioni et al., 2008; Tepass et al., 1990). Vielmehr weist die L-Domäne durch die Expression extrazellulärer Matrixproteine wie Laminin A und Perlecan und der Expression der Rezeptoren wie Dystroglycan und α PS3/ β PS1 Integrin einige klassische Membranmarker einer Basalmembran auf (Hollfelder et al., 2014; Medioni et al., 2008; Vanderploeg et al., 2012; Yarnitzky und Volk, 1995). Ein weiteres Merkmal der L-Domäne ist zudem die Expression der Rezeptoren Robo1/2 und Unc5 sowie derer Liganden Slit und NetrinB (Albrecht et al., 2011; Medioni et al., 2008; Qian et al., 2005b; Santiago-Martínez et al., 2006).

1.3.3 Funktion der Robo/Slit- und Unc5/NetrinB-Signalwege während der Lumenbildung

Für die Lumenbildung des Dorsalgefäßes wurden die Konstriktion *der Leading edge*, die Abstoßung von spezifischen Membranmarkern an der L-Domäne und die Zellformänderungen der Kardioblasten als treibende Kräfte beschrieben (Medioni et al., 2008). Dies steht im Gegensatz zur epithelialen Tubulogenese, bei der Vesikel mit apikalen Membranproteinen an der zukünftigen apikalen Membranregion fusionieren und dabei das Lumen formen (Kamei et al., 2006; Kerman et al., 2006). Vielmehr ähnelt die Lumenbildung des Dorsalgefäßes von *Drosophila* in einigen Punkten der Bildung von Blutgefäßen in Vertebraten. So weisen die luminalen Membrankompartimente sich entwickelnder Blutgefäße wie beispielsweise der Aorta ähnlich wie die L-Domäne des Dorsalgefäßes Merkmale einer Basalmembran auf. Zudem spielen Zellformveränderungen und die Expression von nicht-adhäsiven, repulsiv wirkenden Molekülen an der luminalen Membrandomäne der sich bildenden

Aorta eine entscheidende Rolle bei der Lumenbildung (Iruela-Arispe und Davis, 2009; Strilić et al., 2009; Strilić et al., 2010).

Ähnlich zu der Lumenbildung der Aorta in Vertebraten, werden bei *Drosophila* an der L-Domäne der Kardioblasten mit Robo/Slit und Unc5/NetrinB zwei Rezeptor/Ligandenpaare exprimiert, die die Repulsion der luminalen Membranseite der Kardioblasten vermitteln.

Mutanten dieser repulsiv wirkenden Rezeptor/Ligandenpaare zeigen Anordnungsfehler der Kardioblasten und Defekte des Herzlumens (Albrecht et al., 2011; MacMullin und Jacobs, 2006; Medioni et al., 2008; Qian et al., 2005b; Santiago-Martínez et al., 2006; Santiago-Martínez et al., 2008).

Bei dem Prozess der Lumenbildung nimmt vor allem der Robo/Slit-Signalweg eine Schlüsselrolle ein, da er die L-Domäne definiert und die Expression der Adhäsionsproteine auf die J-Domänen begrenzt. In Mutanten für *slit* und/oder *robo* wird kein Herzlumen ausgebildet und die Kardioblasten adhärieren entlang einer komplett ausgebildeten Kontaktseite (Medioni et al., 2008; Santiago-Martínez et al., 2008). Zudem unterbleiben in den Mutanten die für die Lumenbildung wichtigen Veränderungen der Kardioblastenzellform. Ein mögliche Ursache für die nicht erfolgten Zellformveränderungen könnte sein, dass die Lokalisation des Zytoskelettregulators Enabled/ VASP in den Mutanten verändert ist (Santiago-Martínez et al., 2008).

Unabhängig vom Robo/Slit-Signalweg ist auch der Unc5/NetrinB-Signalweg an der Lumenbildung beteiligt. In Mutanten für *unc5* oder *NetB* unterbleiben die sichelförmigen Zellformveränderungen der Kardioblasten, so dass sich die Kardioblasten aneinanderlagern ohne ein Lumen auszubilden (Albrecht et al., 2011). Anders als in Mutanten des Robo/Slit-Signalwegs ändert sich die Polarität der Kardioblastenmembran nicht und auch eine Ausbreitung der J-Domänen entlang der gesamten Kontaktseite ist nicht zu beobachten (Albrecht et al., 2011).

1.3.4 Rolle von Zell-Matrix-Adhäsionen bei der Herzentwicklung in *Drosophila*

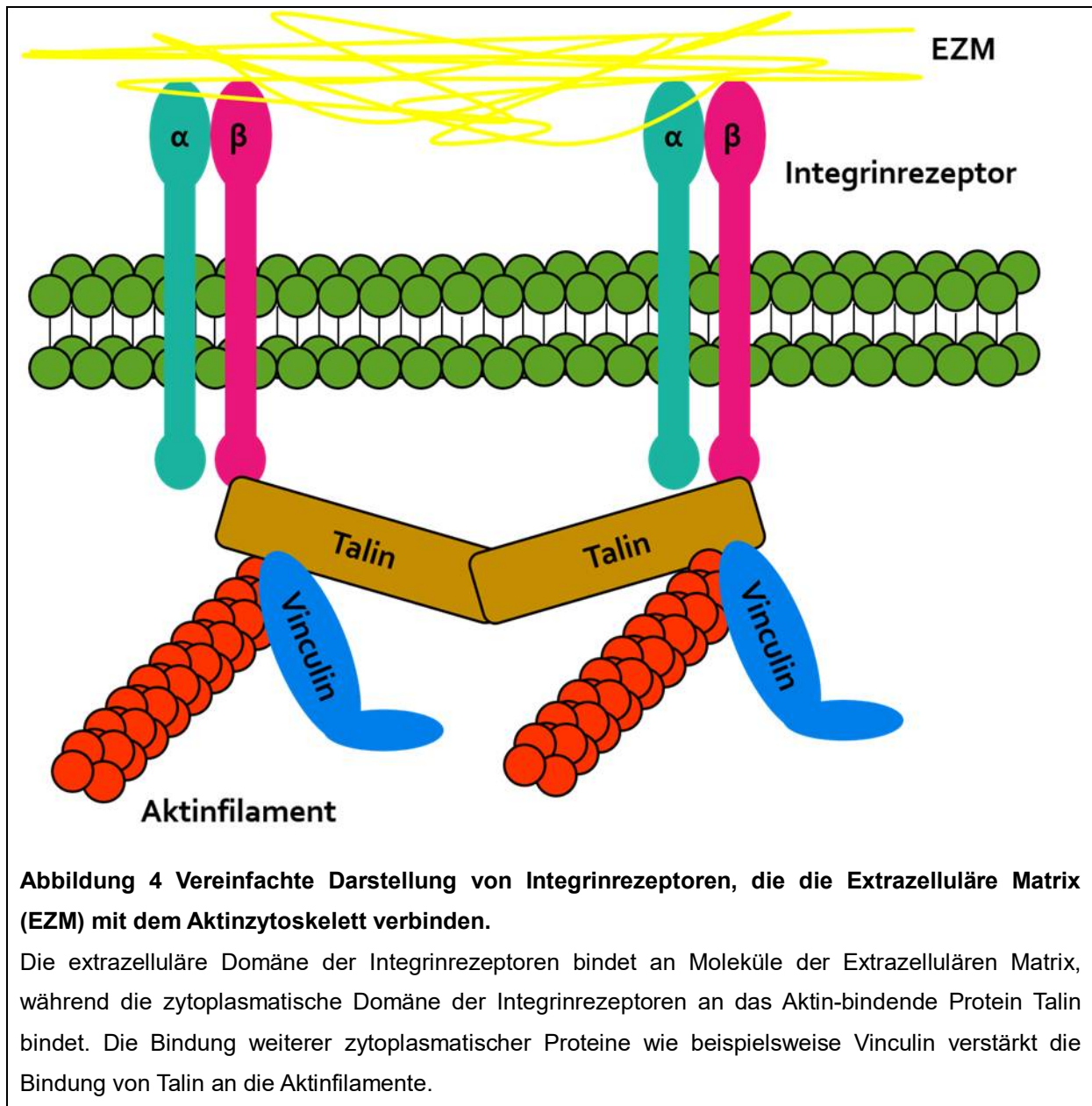
Bei der Bildung von Geweben spielen neben Zell-Zell-Adhäsionen auch Zell-Matrix-Adhäsion eine bedeutende Rolle. Während Zell-Zell-Adhäsionen vor allem durch Cadherine vermittelt werden, sind Integrine an der Ausbildung von Zell-Matrix-Adhäsionen beteiligt (Hynes, 2002).

Integrine sind Transmembranrezeptoren aus einer α - und einer β -Untereinheit, die über eine extrazelluläre Domäne und zwei zytoplasmatische Domänen verfügen. Mit der extrazellulären Domäne binden Integrinrezeptoren Proteine der Extrazellulären Matrix, während die zytoplasmatischen Domänen mit über 50 verschiedenen Proteinen interagieren (Abbildung 4; Clark und Brugge, 1995; Hynes, 2002). Zu diesen zytoplasmatischen Proteinen gehören unter anderem Ilk (*Integrin-linked kinase*), Parvin, FAK (*Focal adhesion kinase*), Paxillin, Talin, Vinculin, Tensin, α -Actinin und Vertreter der SoHo-Proteinfamilie (Zamir und Geiger, 2001). Die Integrine stellen demnach eine Verbindung der Extrazellulären Matrix mit dem Aktinzytoskelett her und regulieren dabei Prozesse wie Zellmigration, Zellwachstum, Zellformveränderungen, Zellpolarität und Signalübertragung (Clark und Brugge, 1995; Hynes, 2002).

In migrierenden Zellen sind die Integrine zunächst in punktförmigen fokalen Adhäsionskomplexen an den Enden von Lamellipodien zu detektieren. Die fokalen Adhäsionskomplexe vergrößern sich und entwickeln sich später zu fokalen Adhäsionskontakten in der Peripherie der Zelle (Geiger und Bershadsky, 2001).

Die Ausbildung von fokalen Adhäsionskomplexen/-kontakten ermöglicht zum einen die Substratadhäsion als auch die gezielte Ausrichtung von Aktinfilamenten und spielt damit eine essentielle Rolle bei der Ausbildung von Zellpolaritäten, gerichteter Zellmigration, sowie Zellwachstum und Zellformveränderungen (Zamir und Geiger, 2001). An diesen Prozessen ist auch die SoHo-Proteinfamilie beteiligt, deren einziges Ortholog in *Drosophila*, das in dieser Arbeit untersuchte CAP-Protein ist (siehe Kapitel 1.6).

Eine Besonderheit der Integrine ist, dass sie Signale bidirektional verarbeiten. So werden zum einen Signale der Extrazellulären Matrix ins Zellinnere weitergeleitet, die zu Veränderungen innerhalb der Zelle führen können und zum anderen werden Signale des Zellinneren an die Extrazelluläre Matrix weitergegeben, wodurch dann die Zusammensetzung der EZM beeinflusst werden kann (Delon und Brown, 2007).



In *Drosophila* wurden 5α - (αPS1-5) und 2β - (βPS und βv) Integrinuntereinheiten identifiziert, wobei im Dorsalgefäß nur der αPS3/βPS1 Integrinrezeptor exprimiert wird (Lo, 2006; Stark et al., 1997).

Kürzlich wurde gezeigt, dass Integrine zu den ersten Proteinen gehören, die an der L-Domäne akkumuliert werden und dort zur Stabilisierung der Robo/Slit-Signale an der L-Domäne führen (Vanderploeg et al., 2012). Zudem zeigte die Studie, dass Integrine zudem für die Aktivität der *Leading edge* und für die Ausbildung eines Herzlumens wichtig sind. So bilden Mutanten für αPS3 Integrin, kodiert von dem Gen *scab*, kein Lumen zwischen den kontralateralen Kardioblasten aus. Des Weiteren ist in Mutanten für αPS3 Integrin und βPS1 Integrin die Verteilung des Extrazellulären

Matrix Proteins Pericardin und die Verbindung mit den Perikardialzellen gestört. Ein genetischer Interaktionstest von α PS3 Integrin mit verschiedenen Proteinen des Integrinsignalwegs zeigt, dass die beschriebene Akkumulation und Stabilisierung der Robo/Slit-Signale an der L-Domäne vermutlich adhäsionsabhängig ist (Vanderploeg et al., 2012).

Der besondere Aufbau der Extrazellulären Matrix im Dorsalgefäß

Während der Organogenese spielt die Extrazelluläre Matrix (EZM) eine wichtige Rolle, da sie Gewebe voneinander abgrenzt, Einfluss auf den Zellstoffwechsel, die Zellpolarität und die Zelldifferenzierung hat und den migrierenden Zellen als Substrat dient (Pastor-Pareja und Xu, 2011; Urbano et al., 2009; Urbano et al., 2011).

Die spezialisierte Form der Extrazellulären Matrix von Epithelzellen wird auch als Basalmembran bezeichnet. Die Hauptbestandteile der Basalmembran sind Proteine wie Kollagen Typ IV (in *Drosophila* Viking und Cgc25c) und Laminin (in *Drosophila* Laminin A, Wingblister, Laminin B1 und Laminin B2) sowie Nidogen und Proteoglykane wie Perlecan (in *Drosophila* Trol) (Drechsler et al., 2013; Martin et al., 1999; Tepass und Hartenstein, 1994; Urbano et al., 2009; Urbano et al., 2011; Wolfstetter und Holz, 2012; Yarnitzky und Volk, 1995).

Ähnlich der Kompartimentierung der Kardioblastenmembran, weist das Dorsalgefäß von *Drosophila* zwei verschiedenen Arten von extrazellulärer Matrix auf, die sich in ihrer Zusammensetzung unterscheiden.

So beinhaltet die Basalmembran, die die Kardioblasten und Perikardialzellen umgibt und für die Adhäsion zwischen den beiden Zelltypen verantwortlich ist (Haag et al., 1999) das Kollagen Typ IV ähnliche Protein Pericardin. Dabei ist Pericardin spezifisch an der Außenseite zwischen den Kardioblasten und den Perikardialzellen lokalisiert, fehlt aber der EZM der L-Domäne. Mutanten für Pericardin zeigen Defekte während der Herzmorphogenese, die sich in fehlangeordneten Kardioblasten als auch Perikardialzellen äußern (Chartier et al., 2002). Drechsler et al. identifizierten als sekretierten Rezeptor für Pericardin das ADAMTS-ähnliche Homolog Lonely heart (Loh). Mutanten von Pericardin und Loh zeigen Defekte in der Integrität des Dorsalgefäßes sowie Probleme bei der Kontraktilität (Drechsler et al., 2013).

Die zweite Art Basalmembran ist in der L-Domäne der Kardioblasten lokalisiert und weist das extrazelluläre Matrixprotein Multiplexin auf. Bei Multiplexin handelt es sich

um das *Drosophila* Ortholog von Kollagen XVIII und Kollagen XV. Harpaz et al. zeigten, dass Multiplexin an der Ausbildung des größeren Lumens im Herz des Dorsalgefäßes beteiligt ist (Harpaz et al., 2013).

Denn betrachtet man das Lumen des Dorsalgefäßes entlang der anteroposterioren Achse, so fällt auf, dass die Aorta über ein kleineres Lumen als das Herz verfügt. Da Slit und die Robo-Rezeptoren uniform entlang der anteroposterioren Achse des Dorsalgefäßes exprimiert werden, stellt sich die Frage, wie es zu dem größeren Lumen im Herz des Dorsalgefäßes kommt.

Multiplexin wird gegen Ende der Lumenbildung im Embryonalstadium 16 spezifisch im Herz exprimiert und bildet zusammen mit Slit Komplexe aus, die die Robo/Slit-Aktivität erhöhen. Dadurch werden die F-Aktin-Level spezifisch im Bereich der luminalen Membran des Herzens reduziert und der Abbau von β -Catenin/ Armadillo beschleunigt. Diese beiden Prozesse erleichtern die Einwärtskrümmung der luminalen Membran, wodurch es zur Ausbildung eines größeren Lumens kommt. Ein Verlust von Multiplexin führt nicht nur zu verkleinerten Lumen im Herz des Dorsalgefäßes, sondern auch zu einer verminderten Kontraktilität und einer Reduktion der systolischen Verkürzungsfraction (*fractional shortening*) des adulten Dorsalgefäßes (Harpaz et al., 2013).

Integrine und das Aktinzytoskelett während der Lumenbildung

Für die Migration der Kardioblasten, sowie die Zellformveränderungen während der Lumenbildung sind die Umorganisationen des Aktinzytoskeletts wichtig (Medioni et al., 2008). Durch Modulierung der Aktivität von Rho-GTPasen beeinflussen Integrin-EZM Interaktionen die Organisation des Aktinzytoskeletts und regulieren damit Prozesse wie die Migration und Ausbreitung von Zellen oder auch Zellformveränderungen (Schwartz und Shattil, 2000). Genetische Analysen zeigen die Beteiligung der Rho-GTPasen Rho1, Rac1 und Cdc42 bei dem Prozess des Rückenschlusses (*dorsal closure*) in *Drosophila* (Harden et al., 1999; Lu und Settlemann, 1999; Magie et al., 1999; Woolner et al., 2005). Obwohl die Funktion der Rho-GTPasen bei der Epithelmorphogenese gut untersucht ist, war bisher sehr wenig bekannt über die Rolle der Rho-GTPasen bei der Entwicklung des Dorsalgefäßes in *Drosophila*.

Erst kürzlich erschienen jedoch zwei Veröffentlichungen, die die Funktionen der Rho-GTPase Cdc42 bei der Herzmorphogenese von *Drosophila* beschreiben (Swope et al., 2014; Vogler et al., 2014).

Swope et al. (2014) zeigten, dass zunächst Zellkontakte zwischen kontralateralen Tinman exprimierenden Kardioblasten entlang der anteroposterioren Achse ausgebildet werden. Dabei treibt Cdc42, das nur in den Tinman und nicht in Seven up exprimierenden Kardioblasten vorzufinden ist, die Migration der Tinman exprimierenden Kardioblasten in Richtung der dorsalen Mittellinie an. In Mutanten für Cdc42 schaffen es die Tinman exprimierenden Kardioblasten nicht zu fusionieren, so dass es zu Lücken innerhalb des Dorsalgefäßes kommt. Dahingegen hat ein Verlust der Cdc42 Funktion keinen Einfluss auf die Migration und Fusionierung der Seven up exprimierenden Kardioblasten (Swope et al., 2014).

Vogler et al. (2014) zeigten zudem, dass Cdc42 und Formine wie dDAAM und Diaphanous die Lokalisation von Slit und dem nicht-muskelspezifischen Myosin II, Zipper, an der L-Domäne kontrollieren und somit die Lumenbildung beeinflussen.

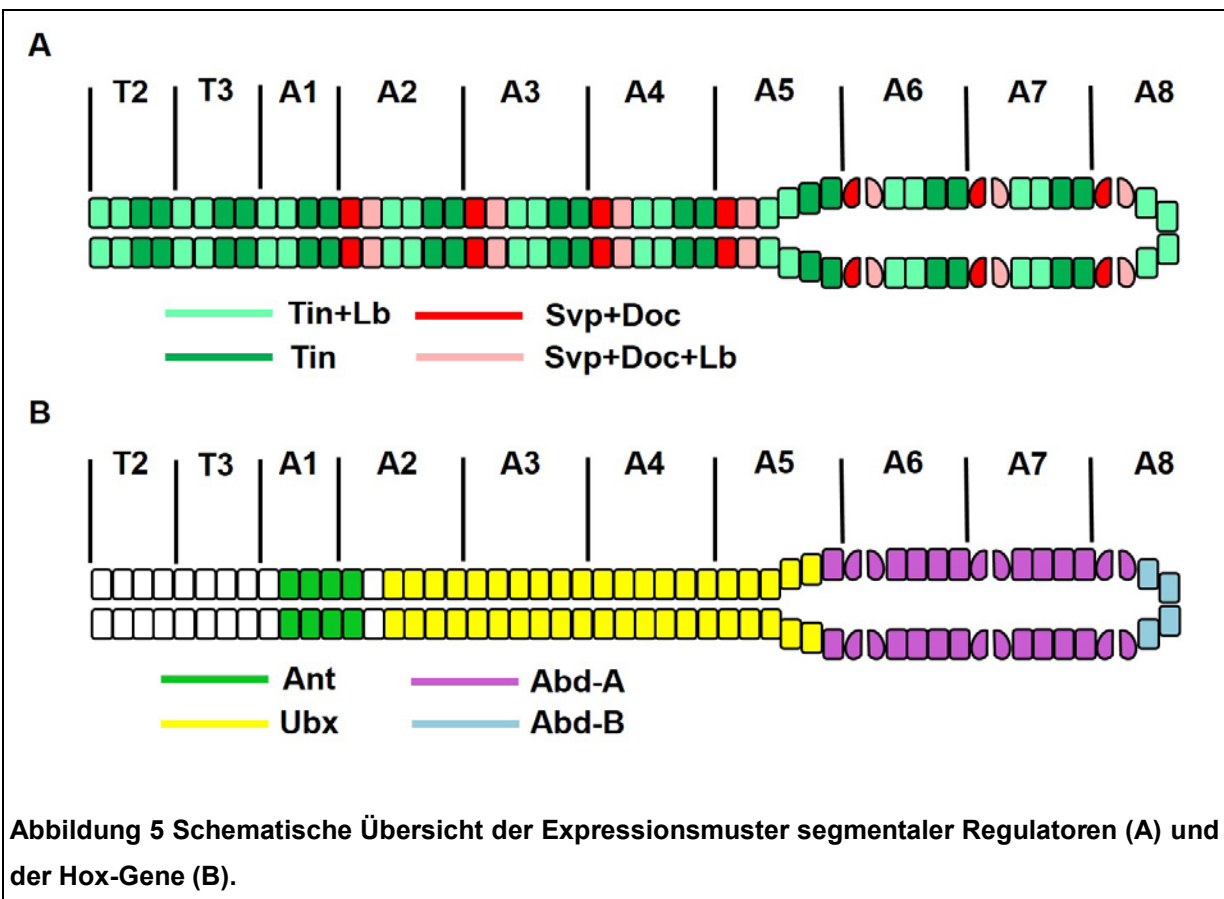
1.4 Anteroposteriore Organisation des Dorsalgefäßes

Das Dorsalgefäß von *Drosophila* besitzt eine intrinsische A-P Polarität, die mit dem segmentalen Körperbau der Fliege einhergeht. Diese Polarität ist verknüpft mit den verschiedenen funktionalen Regionen des Dorsalgefäßes. Bereits im Embryonalstadium 13 ergibt sich somit eine Hauptunterteilung des Dorsalgefäßes in Seven up und Tinman exprimierende Kardioblasten. Dabei besteht jedes Hemisegment aus zwei Seven up positiven und vier Tinman positiven Kardioblasten. Die einzige Ausnahme stellt die anteriore Aorta in den Segmenten T2, T3 und A1 dar, deren Hemisegmente von je vier Tinman exprimierenden Kardioblasten gebildet werden (Abbildung 5A). Während Svp die Expression von *tinman* in den Seven up positiven Kardioblasten inhibiert, begrenzt Tinman wiederum die Expression von *Doc* auf die Seven up exprimierenden Kardioblasten (Abbildung 2; Lo und Frasch, 2001; Ponzielli et al., 2002; Ryan et al., 2007).

Doch wie kommt es zu diesen beiden Differenzierungsgruppen? Zaffran et al. (2006) zeigten, dass bei einem Verlust von *tinman* im kardialen Mesoderm, die *Doc* Expression in Bereiche der Seven up negativen Kardioblasten expandiert und zu einem partiellen Umschalten des Zellschicksals von generischen zu ostialen Kardioblasten führt (Zaffran et al., 2006).

Der gleiche Phänotyp kann auch in *Mid/Nmr2*- und *H15/Nmr1*-Mutanten beobachtet werden (Reim et al., 2005). Bei *Mid/Nmr2* und *H15/Nmr1* handelt es sich um Zielgene von Tinman, Pannier und Dorsocross, die nach deren Aktivierung die *tinman* Expression in den generischen Kardioblasten aufrechterhalten (Qian et al., 2005a; Reim et al., 2005).

Diese Unterteilung ist für die spätere Funktion des Dorsalgefäßes von entscheidender Bedeutung. So exprimieren die drei Paare Seven up positiver Kardioblasten im Herz zusätzlich Wingless und bilden am Ende der Embryogenese die Einstromöffnungen für die Hämolymphe. Die in der Aorta lokalisierten Seven up positiven Kardioblasten bilden nach der Umformung des larvalen in das adulte Dorsalgefäß ebenfalls Ostia aus (Molina und Cripps, 2001). Dahingegen werden die Tinman positiven Kardioblasten als „arbeitende oder generische Kardioblasten“ bezeichnet, die aufgrund ihrer Funktion weitere Differenzierungsgene wie *ndae1* (*Na⁺-dependent bicarbonate anion exchanger I*) und *ORK1* (*a two pore domain potassium channel*) im Herz sowie *SUR* (*K⁺-ATP channel subunit Sulfonylurea receptor*) im gesamten Dorsalgefäß exprimieren (Akasaka et al., 2006; Hendren et al., 2007; Lalevée et al., 2006; Nasonkin et al., 1999; Perrin et al., 2004).



Andere Differenzierungsgene wie *Toll*, *Mef* oder *Hand* besitzen Enhancer-Elemente für beide Kardioblastengruppen und sind gleichmäßig im gesamten Dorsalgefäß exprimiert (Gajewski et al., 1997; Han und Olson, 2005; Sellin et al., 2006; Wang et al., 2005).

Für die Unterteilung des Dorsalgefäßes in eine anteriore Aorta und eine posteriore Aorta/Herzregion, sind die homeotischen (Hox-) Gene *Antennapedia (Ant)*, *Ultrabithorax (Ubx)*, *abdominal-A (abd-A)* und *Abdominal-B (Abd-B)* wichtig. Die Hox-Gene werden in verschiedenen Regionen des Dorsalgefäßes entlang der A-P Achse exprimiert (Abbildung 5B; Perrin et al., 2004). Dabei ist eine Hauptfunktion der Hox-Gene innerhalb des kardialen Mesoderms, zusammen mit segmentalen Regulatoren wie beispielsweise Hedgehog, die Vorläufer der Seven up exprimierenden Kardioblasten und Perikardialzellen auszuprägen. Zudem beeinflussen die Hox-Gene auch die Art der Zellteilungen innerhalb der Tinman exprimierenden Vorläufer. Während sich die Vorläufer der Tinman exprimierenden Kardioblasten innerhalb der anterioren Aorta asymmetrisch in einen Kardioblasten und eine Perikardialzelle teilen, erfolgt die Teilung der Tinman Vorläufer innerhalb der posterioren Aorta und des Herzens symmetrisch in zwei Tinman exprimierende Kardioblasten (Abbildung 5A; Alvarez et al., 2003; Ryan et al., 2005).

Das Hox-Gen *abd-A* spielt bei der Differenzierung zwischen Aorta und Herz eine Hauptrolle. Die Expression von *abd-A* in der Herzregion führt zur Aktivierung herzspezifischer Differenzierungsgene wie *ndae1* (nur in Tin+ abd-A+ Kardioblasten) und *wg* (nur in Svp+ Doc+ abd-A+ ostialen Kardioblasten) (Perrin et al., 2004; Reim und Frasch, 2005). So wird in *abd-A*-Mutanten das Herz in eine Aorta transformiert, während bei ektopischer Überexpression von *abd-A* die Aorta Eigenschaften der Herzregion ausprägt (Lo et al., 2002; Lovato et al., 2002; Ponzielli et al., 2002).

1.5 Umstrukturierungen vom larvalen zum adulten Dorsalgefäß

Am Ende des Embryonalstadiums 17 beginnt das Dorsalgefäß unregelmäßig zu kontrahieren. Während der drei Larvalstadien nimmt das Dorsalgefäß an Größe in der anteroposterioren Ausrichtung zu. Diese Größenzunahme ist jedoch nicht auf eine Zunahme der Kardioblastenanzahl, sondern auf ein Zellwachstum der Kardioblasten zurückzuführen (Molina und Cripps, 2001; Sellin et al., 2006). Das larvale Dorsalgefäß gliedert sich weiterhin in drei Bereiche: anteriore Aorta, posteriore Aorta und Herz. Die posteriore Aorta und das Herz sind durch ein internes

Klappenpaar voneinander separiert. Während der puppalen Metamorphose kommt es zu weitreichenden morphologischen und funktionalen Umstrukturierungen des larvalen Dorsalgefäßes. Das kontraktile Myokard des adulten Dorsalgefäßes bildet sich aus der larvalen posterioren Aorta (Abdominalsegmente A2 - A5). Das larvale Abdominalsegment A6 bildet die terminale Kammer des adulten Dorsalgefäßes aus und die letzten beiden Abdominalsegmente A7 und A8 werden histolysiert (Lo und Frasch, 2003). Auch die anteriore Aorta wird restrukturiert und erstreckt sich nach der Metamorphose bis in den adulten Kopfbereich (Rizki, 1978). Die Umstrukturierungen sind etwa 80 h AFP (*after pupae formation*) abgeschlossen und die Funktionalität der Ostia und der Klappen kann beobachtet werden (Sellin et al., 2006). Das adulte Dorsalgefäß erstreckt sich vom 6. Abdominalsegment bis zum Gehirn und weist eine Gliederung in 4 Kammern auf, die jeweils durch interne Klappenpaare voneinander separiert sind. Die Segmente A1 und A2 sind im Verlauf der Umstrukturierungen miteinander fusioniert und haben die vordere Herzkammer (auch *conical chamber*) gebildet (Curtis et al., 1999; Rizki, 1978). Zudem hat sich das Dorsalgefäß im Verlauf der Metamorphose gekrümmt und folgt nun der Kontur des Abdomens der adulten Fliege. An der ventralen Seite des adulten Dorsalgefäßes hat sich eine Schicht aus longitudinalen Muskeln ausgebildet (Curtis et al., 1999; Molina und Cripps, 2001), die durch Transdifferenzierung aus spezifischen Alar Muskeln der Larve gebildet wurden (Schaub et al., 2015).

Während des Remodellierungsprozesses kommt es auch zu transkriptionellen Veränderungen. Signale des Steroidhormons 20-Hydroxyecdysol regulieren die Expression von Ubx und die Aktivität von abd-A während der Bildung des adulten Dorsalgefäßes. Die Seven up exprimierenden Kardioblasten der larvalen posterioren Aorta beginnen *wg* zu exprimieren und entwickeln sich zu funktionalen ostialen Zellen. Dahingegen weisen die Tinman exprimierenden Kardioblasten des Myokards mehr Myofibrillen auf, aktivieren die Expression von *ndael* sowie *lh* und erlangen kontraktile Aktivität (Monier et al., 2005).

Zusätzlich sind weitere Signalwege identifiziert worden, die bei der morphologischen Umstrukturierung vom larvalen zum adulten Dorsalgefäß beteiligt sind. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass der Wg-Signalweg sowohl bei der Differenzierung der Ostia als auch bei der Formation der terminalen Herzkammer eine Rolle spielt (Zeitouni et al., 2007). Zudem scheinen Wg-Signale auch für die Orientierung der Myofibrillen entscheidend zu sein, da eine Blockierung der

Wg-Signalwegs zur Ausbildung von longitudinalen anstatt zirkulären Myofibrillen führt (Monier et al., 2005; Zeitouni et al., 2007). Des Weiteren konnte auch eine Beteiligung des PDGF-VEGF-Signalwegs an der Formation der Herzklappen nachgewiesen werden (Zeitouni et al., 2007).

1.6 Adapterproteine der SoHo-Familie

Die Adapterproteine der SoHo-Familie bestehen in Vertebraten aus CAP/Ponsin (*SORBS1*), ArgBP2 (*SORBS2*) und Vinexin (*SORBS3*) und werden auch als CAV-Proteine (**C**AP/**P**onsin, **A**rgBP2 und **V**inexin) bezeichnet. Die Proteinstruktur dieser Proteinfamilie ist charakterisiert durch eine N-terminale SoHo-Domäne und drei C-terminale SH3 (*Src-homology 3*)- Domänen (Kioka et al., 2002; Roignot und Soubeyran, 2009). Die SoHo-Domäne wurde aufgrund ihrer hohen Homologie nach dem Peptid Sorbin benannt (Charpin et al., 1992; Pansu et al., 1981). Die SH3-Domänen sind bekannt für die Bindung an Prolin-reiche Sequenzen mit der Sequenz (PXXP), wodurch die SoHo-Proteine eine breite Spezifität aufzeigen und mit verschiedenen Proteinen interagieren (Tabelle 1; Buday, 1999; Kaneko et al., 2008; Mayer, 2001). Interessanterweise weisen die SoHo-Proteine selbst auch Prolin-reiche Sequenzen auf, die wiederum auch als Bindungssequenzen für andere SH3-Proteine fungieren (Cowan und Henkemeyer, 2001). Proteine dieser Familie sind an der Regulierung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion, der Organisation des Aktinzytoskeletts und der Signaltransduktion beteiligt (Tabelle 1; Kioka et al., 2002; Roignot und Soubeyran, 2009; Tomasovic et al., 2012).

So ist CAP/Ponsin beispielsweise nicht nur an der Regulation des Aktinzytoskeletts und der Zell-Adhäsion beteiligt, sondern spielt auch eine Rolle bei der Differenzierung von Muskel- und Fettzellen (Gehmlich et al., 2010; Tomasovic et al., 2012; Zhang et al., 2003). CAP/Ponsin wirkt zudem an der Signaltransduktion verschiedener Rezeptortyrosinkinasen und von Insulinrezeptoren mit (Baumann et al., 2000; Kimura et al., 2001; Tomasovic et al., 2012).

ArgBP2 scheint hauptsächlich an der Regulation des Aktinzytoskeletts beteiligt zu sein. Mit der SoHo-Domäne bindet ArgBP2 unter anderem an α -Spectrin und Flotilin-1 und die SH3-Domänen binden verschiedene Proteine wie beispielsweise die GTPasen Dynamin-1 und -2, Vinculin und c-Abl, die die Organisation des Aktinzytoskeletts regulieren (Cestra et al., 2005; Haglund et al., 2004; Kawabe et al., 1999; Wang et al., 1997).

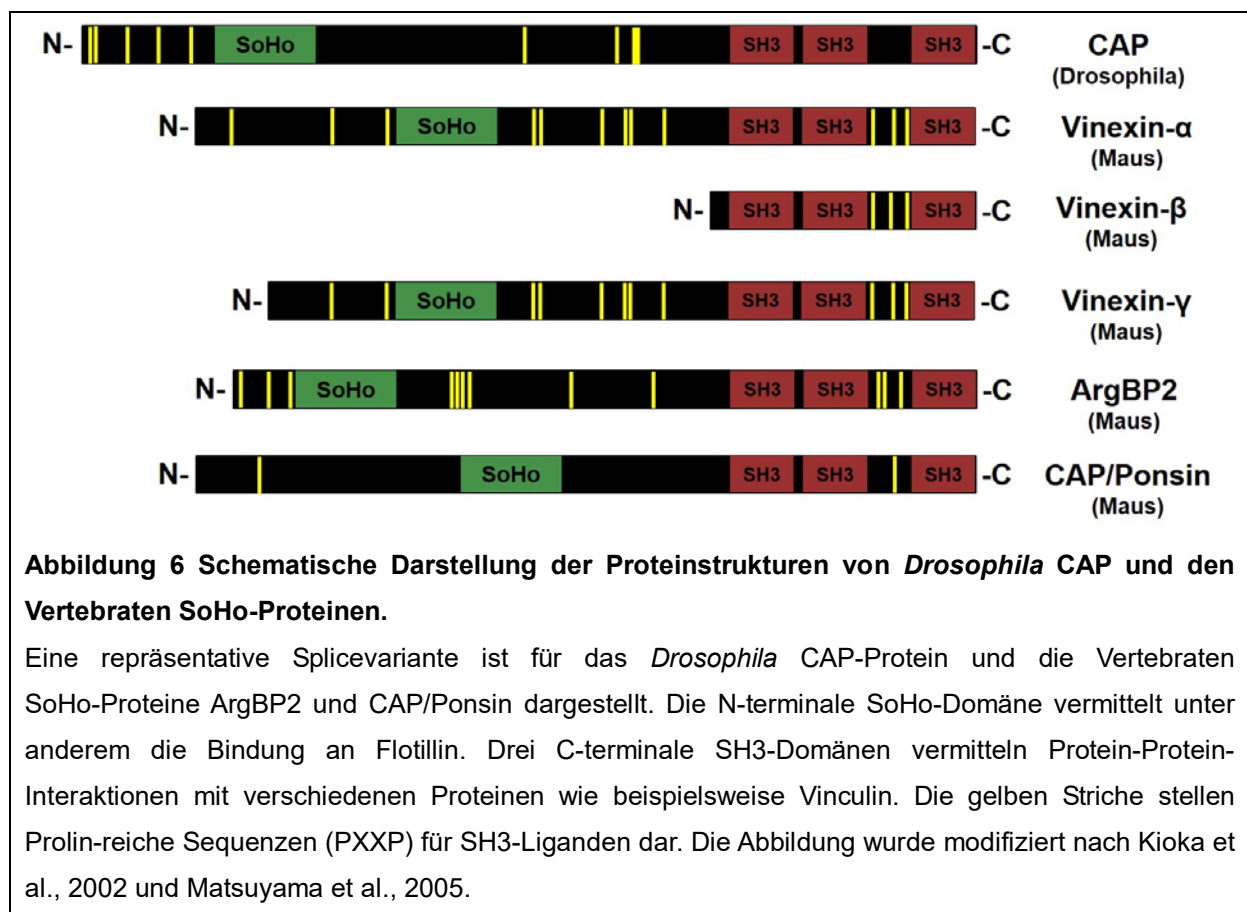
Vinexin wurde bereits als Vinculin-bindendes Protein identifiziert und ist wie auch die anderen Mitglieder der SoHo-Proteinfamilie an den fokalen Adhäsionskontakten und den Adherens Junctions lokalisiert (Kioka et al., 1999; Kioka et al., 2010; Mizutani et al., 2007). Dabei ist Vinexin durch die Regulation der Umstrukturierungen des Aktinzytoskeletts unter anderem in Prozessen wie Zellmigration, Zellausbreitung und bei der Bildung von Aktin-Stressfasern involviert (Kioka et al., 1999; Mitsushima et al., 2006; Mizutani et al., 2007; Takahashi et al., 2005).

Tabelle 1 Übersicht über die SoHo-Proteinfamilie in Vertebraten

SoHo-Protein	Isoform	Interaktionspartner	Funktionen
CAP/Ponsin	CAP1	c-Cbl, c-Abl, Insulin	Insulin-Signalweg,
	CAP2	Rezeptor, SOS, Vinculin,	Glucose-Transport, Makrophagen
	CAP3	I-Afadin, Flotillin-1, Grb4,	vermittelte Insulin-Resistenz,
	CAP4	Ataxin-7, Paxillin,	ERK-Signalweg,
		Filamin C, sGCBeta1,	Muskeldifferenzierung und
		teneurin-1, APS,	-integrität, Umstrukturierungen des
		Dynamin-1/2, SHIP2,	Aktinzytoskeletts, Zelladhäsion,
		FAK, FRS2	Zellausbreitung und Zellmigration
ArgBP2	A	c-Cbl, c-Abl, c-Arg, Pyk2,	Umstrukturierungen des
	B	Vinculin, I-Afadin, Flotillin,	Aktinzytoskeletts, Zelladhäsion und
	N-ArgBP2	SAPAP, Spectrin,	Zellmigration,
	γ	Synaptojanin-1/2b,	c-Cbl/c-Arg-Signalweg,
		Dynamin1/2, Paladin,	AKT-Signalweg, Pyk2-Signalweg
		α-Aktinin, AKT, PAK1,	und Organisation von Neuriten und
		WAVE1/2; PTP-PEST	Synapsen
Vinexin	α	Vinculin, SOS, Flotillin,	Umstrukturierungen des
	β	p140Cap, HBX, c-Cbl,	Aktinzytoskeletts, Zellausbreitung
	γ	c-Abl, WAVE1/2,	und Zellmigration, ERK-Signalweg,
		N-WASP, SHIP2, c-RAF,	EGFR-Signalweg, Testisbildung,
		ERK1/2; RARgamma,	Retinoid- und
		SOCS-7; Östrogen	Östrogenrezeptor-Signalwege,
		Rezeptoren; SAFB2;	c-Abl-Signalweg
		DLG5	

Die Tabelle zeigt die Isoformen der Vertebraten SoHo-Proteine und deren Interaktionspartner sowie Funktionen. Nach Kioka et al., 2002; Roignot und Soubeyran, 2009; Tomasovic et al., 2012.

Die SoHo-Proteine sind in den meisten Geweben und Zelltypen exprimiert. Einige Isoformen von CAP/Ponsin, ArgBP2 und Vinexin zeigen zudem eine starke Expression im Herzen (Kawauchi et al., 2001; Kioka et al., 2002; Mandai et al., 1999; Wang et al., 1997). Über die Rolle der SoHo-Proteine während der Herzentwicklung ist bisher jedoch erst wenig bekannt. Eine Studie, die Fälle des plötzlichen Todes nach einem Myokardinfarkt untersuchten, zeigte, dass das humane SORBS2 stark im infarzierten Myokard reduziert und dafür in hohen Mengen im Serum der Patienten zu finden war (Kakimoto et al., 2013). Auch im humanen Herzen ist das SORBS2 Protein normalerweise in hohen Mengen exprimiert und lokalisiert wie das Maus ArgBP2 an den Z-Scheiben und den Glanzstreifen (*intercalated discs*) der Kardiomyozyten (Kakimoto et al., 2013; Sanger et al., 2010). Eine weitere Studie beschreibt eine protektive Rolle von CAP/Ponsin bei der viralen Myokarditis durch die Stabilisierung von Interferon Typ I (Valaperti et al., 2014).



In *Drosophila* existiert nur ein Ortholog der Vertebraten SoHo-Proteinfamilie. Das *Drosophila* CAP-Protein weist die typische Proteinstruktur der SoHo-Proteinfamilie auf und die einzelnen Proteindomänen zeigen zudem einen hohen Grad an

Sequenzähnlichkeiten (40 % - 70 %; Abbildung 6; Kioka et al., 2002). Neben den strukturellen Ähnlichkeiten, gibt es auch funktionale Übereinstimmungen zwischen dem *Drosophila* CAP und den Vertebraten SoHo-Proteinen. In *Drosophila* wurde CAP zunächst als *Drosophila*-Homolog eines regulatorischen Glucosetransport-Komplexes identifiziert (Yamazaki und Nusse, 2002). Später zeigte eine weitere Studie, dass CAP die Schnittstelle zwischen der Membran und dem Zytoskelett an den Muskelanheftungsstellen und den chordotonalen Organen von *Drosophila* reguliert. Dabei konnte auch die Bindung von *Drosophila* CAP an Vinculin, einer Komponente des Integrin-Signalwegs, nachgewiesen werden. Obwohl CAP auch im embryonalen Dorsalgefäß detektiert wurde, ist eine mögliche Rolle von CAP bei der Herzentwicklung bisher nicht beschrieben worden (Bharadwaj et al., 2013).

In dieser Arbeit wurde das *Drosophila* CAP Gen in einem *in situ* Screen für die Identifizierung neuer Herzkandidatengene gefunden und anschließend die Rolle von CAP bei der Entwicklung des Dorsalgefäßes von *Drosophila* untersucht.

1.7 Zielstellung der Arbeit

Die Entwicklungsbiologie beschäftigt sich mit der Identifizierung und Charakterisierung von Genen, die die Bildung von spezifischen Zelltypen, Geweben und Organen kontrollieren. Die Entwicklung des Herzens ist dabei von besonderer Bedeutung, da seine Funktion bereits während der Embryogenese für die Lebensfähigkeit des Vertebratenembryos essentiell ist. Um die molekularen Grundlagen der Herzbildung besser verstehen zu können, ist es wichtig Gene, die an der Herzentwicklung beteiligt sind, zu identifizieren und zu charakterisieren.

Um neue an der Herzentwicklung beteiligte Gene bei *Drosophila* zu identifizieren, führte ich einen *in situ* Screen von 101 Kandidatengenen durch, für die bereits eine Hochregulation in der frühen Herzentwicklung von Zebrafisch gezeigt worden war.

Unter den 20 im embryonalen Dorsalgefäß von *Drosophila* exprimierten Genen, war das Gen *CAP*, das für ein zytoplasmatisches Adapterprotein der SoHo-Proteinfamilie kodiert. Die Funktion von *CAP* bei der Entstehung und Funktion des Dorsalgefäßes war bisher nicht bekannt.

In dem zweiten Teil meine Arbeit habe ich daher die Funktion von *CAP* bei der Herzentwicklung analysiert. Dabei wollte ich folgende Fragen klären:

1. Wann und wie ist *CAP* während der Herzentwicklung exprimiert?
2. Wie genau ist das *CAP*-Protein im embryonalen Dorsalgefäß lokalisiert?
Welche Bedeutung hat *CAP* bei der Herzentwicklung im Embryo?
3. Wird das *CAP*-Protein auch in dem larvalen und adulten Dorsalgefäß von *Drosophila* exprimiert? Welche Bedeutung hat das *CAP*-Protein für die Funktion des Dorsalgefäßes?

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von folgenden Herstellern bezogen: Roth GmbH & Co, Sigma-Aldrich, Sigma, MP Biomedicals, Thermo Fisher Scientific, Biozym Diagnostik GmbH, Roche, Bio-Rad Laboratories und Serva Feinbiochemika.

Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden in *A. bidest* (Elga Purelab Classic System) angesetzt und gegebenenfalls zur Sterilisierung bei 121°C und 55kPa für 20 min autoklaviert bzw. bei Hitzeempfindlichkeit der Bestandteile steril filtriert. Die Zusammensetzungen von Puffern und Lösungen sowie alle weiteren Materialien sind an entsprechender Stelle in den nachfolgenden Kapiteln angegeben.

2.1.2 Verwendete Geräte

In der Tabelle 2 sind die wichtigsten, während dieser Arbeit verwendeten, Geräte aufgeführt.

Tabelle 2 Verwendete Geräte

Gerät	Fabrikat, Hersteller
<i>Aqua bidest</i> Anlage	Purelab classic, Elga LabWater, Celle
Autoklav	Varioklav, HP Medizintechnik, Oberschleißheim
Binokulare	SZ51, Olympus, Hamburg SZH10, Olympus, Hamburg
Gelelektrophoresekammern	SE260, Hoefer, Holliston, USA PerfectBlue Gelsysteme, Peqlab, Erlangen
Heizblock	TruTemp™ Microheating System, Sunnyvale, USA
Inkubatoren	Kelvitron®t, Heareus instruments GmbH, Hanau
Kaltlichtquellen	Highlight 3001, Olympus, Hamburg
Mikroskope	IX-71 inverted microscope (DeltaVision spectris imaging system), Applied Precision, Axiophot, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen
PCR-Maschinen	Mastercycler Gradient Thermocycler, Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	701 Calimatic, Knick, Berlin

Gerät	Fabrikat, Hersteller
Schüttler	Innova 400, New Brunswick Scientific, Nürtingen
Sonifizierer	UW70 Ultrasonic head, Bandelin, Berlin
Taumler	Polymax 1040, Heidolph, Schwabach
Vortexer	Votex-Genie 2, Scientific Industries, New York, USA
Waagen	410, KERN & SOHN GmbH, Balingen EG, KERN & SOHN GmbH, Balingen
Zentrifugen	Micro 200R Zentrifuge, Hettich, Tuttlingen

2.1.3 Enzyme und Reagenzienkits

Tabelle 3 Enzyme

Enzyme	Hersteller
DNaseI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DreamTaq DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Restriktionsendonukleasen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SP6 RNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
T4 DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
T7 RNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Tabelle 4 Reagenzienkits

Reagenzienkit	Hersteller
Gelextraktionskit	Peqlab, Erlangen
pGEM®-T Easy Vector System	Promega, Mannheim
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
RevertAid RT Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TSA™ Fluorescein System	PerkinElmer Inc., Waltham, USA

2.1.4 Antikörper

In der Tabelle 5 sind die in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper aufgeführt.

Tabelle 5 Primäre Antikörper

Antigen (Modifikation)	Spezies	Verdünnung	Herkunft/ Referenz
CAP-N	Kaninchen	1:1000	Diese Arbeit
Dig (konjugiert mit Alkalischer Phosphatase)	Schaf	1:2000	Roche Diagnostics
Doc 2+3	Meer-schweinchen	1:300 (+TSA™ Fluorescein System)	I. Reim (Reim et al., 2003)
GFP (A11120)	Maus	1:500	Invitrogen
GFP (A6455)	Kaninchen	1:500	Invitrogen
H2A (Bx65/5)	Maus	unverdünnter Zellkultur-überstand	M. Frasch
Mef2	Kaninchen	1:750	H. T. Nguyen (Bour et al., 1995)
Myc (9e10)	Maus	unverdünnter Zellkulturüberstand	Developmental Studies Hybridoma Bank
Slit (C555.6D)	Maus	1:10	Developmental Studies Hybridoma Bank
Tubulin	Maus	unverdünnter Zellkulturüberstand	M. Frasch
βPS1-Integrin (CF.6G11)	Maus	1:10	Developmental Studies Hybridoma Bank

In der Tabelle 6 sind die in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper aufgeführt.

Tabelle 6 Sekundäre Antikörper

Antigen (Modifikation)	Spezies	Verdünnung	Herkunft/ Referenz
Kaninchen IgG (konjugiert mit Alexa Fluor® 488)	Ziege	1:1000	Invitrogen
Kaninchen IgG (konjugiert mit Alexa Fluor® 555)	Ziege	1:1000	Invitrogen
Kaninchen IgG (konjugiert mit Alkalischer Phosphatase)	Ziege	1:1000	Jackson ImmunoResearch
Maus IgG (konjugiert mit Alexa Fluor® 488)	Ziege	1:1000	Invitrogen
Maus IgG (konjugiert mit Alexa Fluor® 555)	Ziege	1:1000	Invitrogen
Maus IgG (konjugiert mit Alkalischer Phosphatase)	Ziege	1:1000	Jackson ImmunoResearch
Meerschweinchen IgG (biotinyliert)	Ziege	1:200	Vector Laboratories
Meerschweinchen IgG (konjugiert mit Alexa Fluor® 555)	Ziege	1:1000	Invitrogen

2.1.5 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang aufgelistet. Die Oligonukleotide wurden mit dem Programm *OLIGO 7* Primer Analysis Software (Molecular Biology Insights, Inc.) erstellt und von der Firma TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH synthetisiert.

2.1.6 Fliegenstämme

Als Referenzstämme wurden in dieser Arbeit für die *in situ* Hybridisierungen *Oregon R* und für alle weiteren Experimente *w¹¹¹⁸* verwendet. In den nachfolgenden Tabellen sind alle in dieser Arbeit verwendeten Fliegenlinien und ihre Herkunft aufgelistet.

Tabelle 7 Reporterstämme

Fliegenlinie	Genotyp	Chromosom	Herkunft/ Referenz
<i>CAP-GFP</i>	<i>y1 w*</i> ; <i>P{PTT-GA}CAPCA06924</i>	2	FlyTrap collection/ L. Cooley lab (Buszczak et al., 2007; Morin et al., 2001)
<i>HandC3.1-GFP</i>	Keine Angabe	3	(Sellin et al., 2006)
<i>Kettin-GFP</i>	<i>w1118</i> ; <i>P{PTT-un1}sls[ZCL2144]</i>	3	FlyTrap collection/ L. Cooley lab (Hudson et al., 2008)
<i>Zasp52-GFP</i>	<i>w1118</i> ; <i>P{PTT-GB}Zasp52G00189</i>	2	FlyTrap collection/ L. Cooley lab (Morin et al., 2001)

Tabelle 8 Balancerstämme

Fliegenlinie	Genotyp	Chromosom	Herkunft/ Referenz
<i>Dr/ TM3, twiGal4-EGFP</i>	<i>w[1118]</i> ; <i>Dr[Mio]/TM3</i> , <i>P{w[+mC]=GAL4-twi.G}2.3</i> , <i>P{UAS-2xEGFP}AH2.3</i> , <i>Sb[1]</i> <i>Ser[1]</i>	3	Bloomington Drosophila Stock Center, #6663
<i>hs-hid-2, Sp/ CyO</i>	<i>w[1118]</i> ; <i>P{w[+mC]=hs-hid}2</i> , <i>wg[Sp-1]/CyO</i>	2	Bloomington Drosophila Stock Center, #7757
<i>hs-hid-2, Sp/ CyO</i> , <i>twi>>EGFP</i>	Keine Angabe	2	Kombination aus Bloomington#6662 und 7757 (I. Reim)
<i>If/ CyO; MKRS/ TM6,Tb</i>	Keine Angabe	2 und 3	Laborstamm
<i>In(2LR)Gla</i> , <i>wgGla-1/ CyO</i> , <i>twi>>EGFP</i>	<i>w1118</i> ; <i>In(2LR)Gla</i> , <i>wgGla-1/CyO</i> , <i>P{w+mC=GAL4-twi.G}2.2</i> , <i>P{UAS</i> <i>2xEGFP}AH2.2</i>	2	Bloomington Drosophila Stock Center, #6662

Tabelle 9 Defizienzlinie

Fliegenlinie	Genotyp	Chromosom	Herkunft/ Referenz
<i>Df(2R)BSC281/CyO</i>	<i>w[1118]; Df(2R)BSC281/CyO</i>	2	Bloomington Drosophila Stock Center, #23666

Tabelle 10 Mutanten

Fliegenlinie	Genotyp	Chromosom	Herkunft/ Referenz
<i>CAP^{42b}/ CyO, twi>> EGFP</i>	Keine Angabe	2	(Bharadwaj et al., 2013)
<i>CAP^{49e}/ CyO, twi>> EGFP</i>	Keine Angabe	2	(Bharadwaj et al., 2013)
<i>rhea¹/ TM6B, Tb1</i>	<i>y[1] w[1]; P{w[+t*] ry[+t*]=white-un1}70C rhea[1] P{neoFRT}80B/TM6B, P{w[+mC]=iab-2(1.7)/lacZ}6B, Tb[1]</i>	3	Bloomington Drosophila Stock Center, #2296
<i>scb²/ CyO</i>	<i>cn[1] scb[2] bw[1] sp[1]/CyO</i>	2	Bloomington Drosophila Stock Center, #3098

Tabelle 11 UAS-und Gal4-Linien

Fliegenlinie	Genotyp	Chromosom	Herkunft/ Referenz
<i>2xPE-twi-Gal4</i>	<i>y[1] w[*]; P{w[+mC]=GAL4 twi.2xPE}2</i>	2	Bloomington Drosophila Stock Center, #2517 (Baker und Schubiger, 1996)
<i>CAP-RNAi 30506</i>	<i>y[1] sc[*] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HM05250}attP2</i>	3	Bloomington Drosophila Stock Center, #30506
<i>CAP-RNAi 36613</i>	<i>y[1] sc[*] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.GL00573}attP40</i>	2	Bloomington Drosophila Stock Center, #36613

Fliegenlinie	Genotyp	Chromosom	Herkunft/ Referenz
<i>CAP-RNAi</i> 36663	<i>y[1] sc[*] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS01551}attP2</i>	3	Bloomington Drosophila Stock Center, #36663
<i>CAP-RNAi</i> <i>micro3/</i> <i>TM3</i>	Keine Angabe	3	(Bharadwaj et al., 2013)
<i>CAP-RNAi</i> <i>micro6/</i> <i>TM3</i>	Keine Angabe	3	(Bharadwaj et al., 2013)
<i>daGal4</i>	<i>w[*]; P{w[+mW.hs]=GAL4- da.G32}2; MKRS/TM6B, Tb[1]</i>	2	Bloomington Drosophila Stock Center, #55851 (Wodarz et al., 1995)
<i>how^{24B}-Gal4</i>	<i>w[*]; P{w[+mW.hs]=GawB}how[24B]</i>	3	Bloomington Drosophila Stock Center, #1767 (Brand und Perrimon, 1993)
<i>S59-Mef2-HtΔD-Gal4</i>	Keine Angabe	2	(Zaffran et al., 2006)
<i>tinDGal4; tinCΔ4-Gal4</i>	Keine Angabe	2 und 3	Kombination aus <i>tinCΔ4-Gal4</i> und <i>tinD- Gal4</i> (I.Reim)
<i>tinCΔ4-Gal4</i>	Keine Angabe	3	(Lo und Frasch, 2001)
<i>tinD-Gal4(=TMEN6- GAL4 #52D1)</i>	Keine Angabe	2	J. Weiss, OHSU, Portland, USA; (Reim und Frasch, 2005)
<i>twistGal4;how^{24b}Gal4</i>	Keine Angabe	2 und 3	Kombination aus <i>2xPE-twi-Gal4</i> und <i>how^{24B}-Gal4</i> (I.Reim)
<i>UAS-CAP-C/ TM3</i>	Keine Angabe	3	(Bharadwaj et al., 2013)
<i>white-RNAi</i>	<i>P{GMR-w.IR}13D; P{ry[+t7.2]=neoFRT}40A r2d2[S165fsX]</i>	1 und 2	Bloomington Drosophila Stock Center, #32068

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Die folgenden molekularbiologischen Standardmethoden wurden, wenn nicht anderweitig deklariert, wie in Sambrook und Russell (2001) beschrieben, durchgeführt.

- PCR
- Agarosegelelektrophorese
- DNA-Geextraktion
- Ligation
- Klonierung
- Restriktionsverdau
- Herstellung chemisch-kompetenter Zellen
- Transformation in chemisch-kompetente *E. coli* Zellen
- Transformation in BL21 *E. coli* Zellen
- Plasmid-DNA-Extraktion
- Präzipitation von Nukleinsäuren

2.2.1.1 Isolation von genomischer DNA aus Fliegen

Für die Isolation genomischer DNA wurden 30 Fliegen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Zugabe von Extraktionspuffer A wurden die Fliegen homogenisiert und für 30 Minuten bei 65 °C unter mehrfachen invertieren inkubiert. Es folgte die Zugabe von 800 µl Extraktionspuffer B und eine 10-minütige Inkubation auf Eis. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 13000 rpm wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit Isopropanol versetzt und gevortext. Nach erneuter Zentrifugation für 15 Minuten bei 4 °C und 13000 rpm wurde das DNA Pellet mit 75 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 100 µl *A. bidest* aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Extraktionspuffer A: 100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM EDTA; 100 mM NaCl; 0,5 % SDS

Extraktionspuffer B: 1 Teil 5 M Kaliumacetat und 2,5 Teile 6 M Lithiumchlorid

2.2.1.2 Isolation von genomischer RNA aus Fliegen

Für die Isolierung von genomischer RNA aus adulten Fliegen wurden ~ 50 mg Fliegen in flüssigen Stickstoff homogenisiert und mit 1 ml TRIzol® (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) versetzt. Das Gemisch wurde für 5 Minuten bei RT inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 4 °C und 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 200 µl Chloroform versetzt und mehrfach invertiert. Nach 3-minütiger Inkubation bei RT wurde das Gemisch für 15 Minuten bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Dabei wurden die Proteine von der sich in der oberen Phase befindenden RNA getrennt. Die obere, wässrige Phase wurde erneut in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 1-fachem Volumen Isopropanol versetzt und für 10 Minuten bei RT gefällt. Die RNA wurde durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 4 °C und 13000 rpm sedimentiert und das RNA Pellet mit 75 % Ethanol (v/v) gewaschen, luftgetrocknet und in 100 µl *A. bidest* gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.1.3 cDNA Synthese

Zunächst wurden ~ 1 µg RNA mit 1 µl DNase I (1 U/µl; Thermo Fisher Scientific) für 15 Minuten bei 37 °C verdaut. Für die Reverse Transkription der genomischen RNA in cDNA wurde das *RevertAid RT Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben genutzt. Neben den im Kit befindlichen *random Hexamer Primern* wurden noch zusätzlich *Oligo dt Primer* (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.2.1.4 Analyse der Qualität und Quantität der Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Qualität und Quantität der Nukleinsäuren erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung der Proben in einem DNA- bzw. RNA-Agarosegel, und mit Hilfe des NanoDrop® ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer (peqLab).

2.2.1.5 Sequenzierung

Die Sequenzierreaktion sowie die Produktaufreinigung als auch die Produktanalyse wurden von Dr. Martin Meixner (DLMBC, Rüdersdorf) mit einem automatischen ABI 3130XL DNA-Sequenzierer durchgeführt. Der dafür genutzte Reaktionsansatz enthielt 300-400 ng Plasmid-DNA bzw. 15-40 ng PCR-Produkt sowie 10 pmol des entsprechenden Starteroligonukleotids.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Herstellung eines CAP-Antikörpers

2.2.2.1.1 Klonierung des Expressionsvektors

Um einen Antikörper gegen das *Drosophila* CAP-Protein herzustellen, wurde die Sequenz der CAP-N Isoform (NCBI: NP_001137639) mit den Oligonukleotiden 5'-GCAgcggccgcCAGAAGCTCTACC-3' (mit NotI-Restriktionsschnittstelle unterstrichen) und 5'-TGCaagcttCTAGGCCCGTTCCAC-3' (mit HindIII-Restriktionsschnittstelle unterstrichen) aus cDNA amplifiziert und in den pGEM®-T Easy Vektor subkloniert. Mittels Restriktionsverdau mit HindIII und NotI wurde der pMH-Expressionsvektor (Gorchakov et al., 2004) linearisiert und das CAP-N Fragment aus dem pGEM®-T Easy Vektor ausgeschnitten. Es folgte die Ligation des CAP-N Fragments und des pMH-Expressionsvektors. Der Vektor wurde über Hitzeschock in *E. coli* BL21 Zellen transfiziert, ausplattiert und Einzelklone in Übernachtskultur unter Amp-Selektion angezogen.

2.2.2.1.2 Rekombinante Proteinexpression in *E. coli* BL21(DE) Zellen

Um die Löslichkeit des rekombinanten CAP-N Proteins und die Induktionseffizienz der Bakterienklone zu ermitteln, wurden 5 ml Flüssigkulturen im Verhältnis 1:100 mit frischen Übernachtskulturen in Amp-Selektionsmedium inokuliert und bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,6 inkubiert. Nach Erreichen der entsprechenden OD wurden die Kulturen mit 0,2 µl/ml IPTG induziert. Als Kontrolle wurde von jedem Klon ein uninduzierter Ansatz mitgeführt. Die Induktionsdauer betrug maximal 3 h bei 37 °C, wobei auch nach 1 h und 2 h eine Probe genommen wurde. Anschließend wurden die Bakterien bei 4 °C und 4000 x g sedimentiert und in 1 ml Bindepuffer resuspendiert. Zum Aufschluss wurden die Bakterienzellen unter Kühlung auf Eis mit dem GM70 Sonoplus 8-mal für 15 s (mit 20 s Pause zwischen den Durchgängen) bei 72 % der maximalen Amplitude sonifiziert. Die Zellen wurden für 30 Minuten bei 4 °C und 4000 x g abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Falconröhrchen überführt. Das Pellet wurde in 1 ml Bindepuffer resuspendiert. Von den einzelnen Fraktionen wurden 10 µl 1:2 mit SDS-Probenladepuffer versetzt, für 10 Minuten bei 95 °C aufgekocht und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend wurde nach Coomassie-Färbung durch Vergleich der Überstand- und

Pelletfraktion die Proteinlöslichkeit sowie die Induktionseffizienz der Klone des rekombinanten CAP-Proteins ermittelt.

Eine 400 ml Kultur wurde mit dem effizientesten Klon angeimpft und bei einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,6 mit IPTG für 3 h bei 37 °C induziert. Die Zellen wurden, wie bereits beschrieben, sedimentiert, in 100 ml Bindepuffer resuspendiert, sonifiziert und der Überstand für die Ni-NTA-Säulenaufreinigung verwendet.

2.2.2.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einer Höfer SE 260 mini-vertikal Gelelektrophoresekammer in 1x E-Puffer. Es wurden 10 - 12,5 % Trenngele und 4 % Sammelgele genutzt. Als Molekulargewichtsmarker wurde der PageRuler Prestained Protein Ladder oder der PageRuler Prestained Protein Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei konstanten 17 mA pro Gel durchgeführt.

Tabelle 12 Zusammensetzung der SDS-Gele

Komponente	12,5 % Trenngel	10 % Trenngel	4 % Sammelgel
<i>A. bidest</i>	1,92 ml	2,3 ml	2,05 ml
Polyacrylamid	2,07 ml	1,67 ml	0,5 ml
2 M Tris pH 8	0,946 ml	0,94 ml	-
1 M Tris pH 6,8	-	-	0,375 ml
20 % SDS	25 µl	25 µl	15 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	30 µl
TEMED	3 µl	3 µl	3 µl

2x SDS-Probenpuffer: 20 % Glycerin, 4 % SDS, 200 mM β-Mercaptoethanol, 100 mM Tris-HCl, pH 6,8

1x E-Puffer/ 0, 1 % SDS: 25 mM Tris-HCl, 250 mM Glycin, 0,1 % SDS

2.2.2.1.4 Coomassie-Färbung

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde zunächst 3-mal 10 Minuten mit *A. bidest* gewaschen und anschließend für 60 Minuten mit PageBlue Protein Staining Solution (Thermo Fisher Scientific) gefärbt. Zuletzt wurde das Gel nochmals 2 bis 3-mal für 15 Minuten gewaschen.

2.2.2.1.5 Western Blot

Der Transfer der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte mit einer *Hoefer™ TE 22* Transfertankeinheit für 1,5 - 2 h bei 4 °C und konstanten 0,4 A in Transferpuffer. Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulosemembran für eine Stunde mit 5 % Milchpulver in PBS geblockt. Die Nitrocellulosemembran wurde anschließend für 4 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C auf einem Taumler mit dem primären Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 15 Minuten mit 1x PBS erfolgte die Inkubation mit dem alkalische Phosphatase-konjugiertem sekundären Antikörper für 2 – 3 h bei Raumtemperatur auf einem Taumler. Die Nitrocellulosemembran wurde anschließend nochmals 3-mal für 15 Minuten mit 1x PBS, 1-mal kurz und dann für 20 Minuten mit NBT-Puffer gewaschen. Die Detektion der Alkalische-Phosphatase markierten Proteine erfolgte mit NBT-Substratlösung.

10x PBS: 100 mM Na₂HPO₄, 20 mM KH₂PO₄, 1,37 M NaCl, 27 mM KCl, pH 7,4

Blockierlösung: 5 % Milchpulver (Roth) w/v in PBS, pH 7,4

Transferpuffer: 25 mM Tris-HCl, 250 mM Glycin

NBT-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, pH 9,5

NBT-Substratlösung: 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 50 µg/ml NBT, 40 µg/ml BCIP, 0,0015 % DMF, pH 9,5

2.2.2.1.6 Ni-NTA-Säulenaufreinigung

Die Nickel-Affinitäts-Chromatographie-Proteinaufreinigung wurde unter nativen Bedingungen nach Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt. Für die Vorbereitung der Nickel-NTA-Säule wurde eine Fritte (PX11.1, Roth) in einer kleinen

Festphasen-Extraktionssäule (SPE-columns PX08.1, Roth) platziert und 1,5 ml Nickel-NTA Agarose Slurry (QUIAGEN) hinzugefügt, um ein Volumen von 750 µl und eine durchschnittliche Bindekapazität von 30 mg Protein zu erzielen. Die Säule wurde mit 10-fachem Volumen 1x Bindungspuffer äquillibriert und anschließend mit dem Proteinextrakt beladen. Der Durchlauf wurde aufgefangen. Ungebundene Proteine wurden mit 10-fachem Volumen 1x Bindungspuffer, gefolgt von 6-fachem Volumen 1x Waschpuffer von der Säule gewaschen. Anschließend wurden die gebundenen Proteine mit 6-fachem Volumen 1x Elutionspuffer eluiert. Alle Fraktionen wurden gesammelt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Aliquots der einzelnen Fraktionen wurden mit SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

1x Bindungspuffer: 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM Imidazole, pH 7,9

1x Waschpuffer: 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 20 mM Imidazole, pH 7,9

1x Elutionspuffer: 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 1 M imidazole, pH 7,9

2.2.2.1.7 Dialyse

Die Eluatfraktionen der Ni-NTA-Säulenaufreinigung mit dem gewünschten Protein wurden zusammengeführt und dialysiert. Dafür wurde der Dialyseschlauch zunächst (ZelluTrans Dialysiermembran T1 MWCO 3500) mit *A. bidest* nach Herstellerangaben gewaschen und äquillibriert. Die Proteinlösung wurde gegen 500-faches Volumen Dialysepuffer bei 4 °C dialysiert und der Dialysepuffer gegen gekühltes PBS nach 1, 2 und 4 Stunden ausgetauscht. Die finale Dialyse in 1/10 PBS erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die Proteinlösung wurde aus dem Dialyseschlauch gesammelt und die Proteinkonzentration mittels eines Bradfordtests bestimmt. Das Protein wurde lyophilisiert und vor der Immunisierung in 10 % des ursprünglichen Volumens in *A.bidest* aufgenommen.

Dialysepuffer: 13 mM NaCl, 700 µM Na₂HPO₄, 300 µM Na₂HPO₄, pH 7.4

2.2.2.1.8 Affinitätsreinigung des CAP-Antikörpers

Für die Reinigung des CAP-Antikörpers von anderen Serumbestandteilen wurden 0,5 mg rekombinantes CAP-N Protein auf einen Streifen Nitrocellulosemembran appliziert. Die Membran mit dem CAP-N Protein wurde getrocknet und unter UV-Licht

für 1 Minute quervernetzt. Anschließend erfolgte eine 60-minütige Inkubation der Membran mit 5 % Milchpulver in PBS, um die Membran gegen unspezifische Antikörperbindungen abzublocken. Die Membran wurde daraufhin 3 bis 5-mal mit 1x PBS auf einem Taumler gewaschen und über Nacht mit 15 ml CAP-Antiserum (finale Blutung anti-CAP 23304) bei 4 °C taumelnd inkubiert. Das Serum wurde abgenommen und die Membran 1-mal mit 1x PBT und mindestens 3-mal mit 1x PBS gewaschen bis die OD₂₈₀ unter 0,1 war. Um den Antikörper von der Membran zu eluieren, applizierte man 100 mM Glycin pH 2,8 für 10 Minuten. Dieser Vorgang wurde 3-mal wiederholt und das Eluat sofort mit 100 mM Tris pH 8 neutralisiert. Das Eluat wurde anschließend bei 4 °C und 4000 x g in einem Konzentrationsröhrchen von Millipore aufkonzentriert. Der Antikörper wurde zu 50 % mit Glycerin versetzt und bei -20 °C gelagert.

1x PBT: 1x PBS, 0,1 % Triton X-100

2.2.3 Arbeiten mit *Drosophila melanogaster*

2.2.3.1 Stammhaltung und Zucht

Alle Fliegen wurden zur Anzucht und Stammhaltung auf einem Standardmedium in Kunststoffröhrchen bei Raumtemperatur gehalten und alle zwei Wochen umgesetzt. Zur Herstellung des Standardmediums wurden 85 g Agar mit 8 l Leitungswasser aufgekocht und mit 766 g Maisschrot versetzt. Zudem wurden in 2 l Leitungswasser 100 g Sojamehl, 180 g Trockenhefe, 408 g Zuckerrübensirup und 816 g Malzextrakt gelöst und anschließend zu der Agarlösung gegeben. Das Gemisch wurde aufgekocht, danach auf ca. 70 °C abkühlt und um Bakterienwachstum zu verhindern, mit 6 g Nipagin (gelöst in 10 ml Ethanol) sowie 45 ml Propionsäure versetzt.

Das Ziel von Kreuzungen ist die Herstellung von Fliegen mit einem definierten genetischen Hintergrund. Aus diesem Grund ist es wichtig frisch geschlüpfte, jungfräuliche Weibchen für die Kreuzungen zu verwenden. Unbefruchtete, frisch geschlüpfte Weibchen sind deutlich schwächer pigmentiert und das Mekonium, ein dunkler Fleck auf der Unterseite des Abdomens, ist deutlich sichtbar. Alle Kreuzungen und Experimente wurden in Brutschränken bei einer konstanten Temperatur von 25 °C durchgeführt. Für einige Überexpressions- und RNAi-Experimente wurden die Fliegen auch zeitweise bei 29 °C gehalten.

2.2.3.2 Embryonenablage auf Apfelsaftagarplatten

Für die Eiablage wurden 40 – 200 Fliegen in kleinen bis mittleren Fliegenkäfigen auf Apfelsaftagarplatten mit Hefe gehalten. Zunächst erfolgte eine 2-stündige Ablage, um bereits befruchtete Eizellen ablegen zu lassen. Anschließend wurden die Fliegen auf eine frische Apfelsaftagarplatte mit Hefe gesetzt und die Eiablage über Nacht oder für 2 h mit anschließender Alterung der Embryonen für 20 h durchgeführt.

2.2.3.3 Ermittlung der Lebensdauer von adulten Fliegen

Um die Lebenserwartung adulter Fliegen zu ermitteln, wurden die Fliegen direkt nach dem Schlüpfen nach Geschlechtern getrennt und 25 – 30 Fliegen pro Futterröhrchen bei 25 °C gehalten. Die Fliegen wurden alle 2 – 4 Tage auf neue Futterröhrchen überführt und dabei die verstorbenen Tiere in den Futterröhrchen gezählt.

2.2.3.4 Injektionstest zur Ermittlung des kardialen Pumpvermögens nach (Drechsler et al., 2013)

Für die Injektionen wurden Puppen (< 90h APF) auf Objektträger mit doppelseitigen Klebeband fixiert. Nach 10 Minuten wurde das Operculum der Puppen mit feinen Pinzetten entfernt. Für die Injektion wurde eine Glaskapillare mit 10 µl Uraninlösung (1 mg/ml in PBS) befüllt und an einen Mikromanipulator befestigt. Jedem Tier wurde nur ein einziges Mal der Farbstoff lateral in das Abdomen mittels eines Eppendorf FemtoJet Mikroinjektionsapparates injiziert. Die Akkumulation des Farbstoffes wurde über 3 Minuten unter einem Stereomikroskop, besetzt mit einer UV-Lampe und dem dazugehörigen Filter, mit einer Digitalkamera (Canon PowerShot A650 IS) dokumentiert. Die Pixelintensitäten wurden mit dem „Plot-Z-axis profile“ Werkzeug von Fiji (Schindelin et al., 2012) innerhalb der Kopfregion (R.O.I) gemessen.

Für die Mutanten wurden nur die durchschnittlichen Pixelintensitäten der Puppen aufgetragen, die einen Defekt im kardialen Pumpvermögen zeigten.

Dieser Versuch wurde mit Hilfe von Dr. Maik Drechsler in dem Labor von Prof. Dr. Achim Paululat (Universität Osnabrück) durchgeführt.

2.2.3.5 Lebendbeobachtung Fluoreszenz-markierter L3-Larven zur Ermittlung der prozentualen systolischen Verkürzungsfraction

HandC3.1-GFP markierte L3-Larven wurden für 3 Minuten mit Flynap® (Carolina Biological Supply Company) nach Herstellerangaben betäubt und auf Objektträgern mit doppelseitigem Klebeband immobilisiert. Die Larven wurden sofort nach 10 Minuten Erholungszeit mit dem *DeltaVision* Mikroskopsystem und der *SoftWoRx* Software für 1 Minute gefilmt. Die Bildakquisition erfolgte alle 100 ms. Mit der Fiji-Software (Schindelin et al., 2012) wurden die Filme in das AVI-Dateiformat mit 7 Bildern pro Sekunde umgewandelt.

Zur Ermittlung der prozentualen systolischen Verkürzungsfraction wurden die Durchmesser der Herzzellwände für mindestens 6 Systolen und 6 Diastolen pro Larve unter Benutzung der Fiji-Software (Schindelin et al., 2012) gemessen und der Mittelwert sowie die Standardabweichung bestimmt.

Anschließend wurde die prozentuale systolische Verkürzungsfraction folgendermaßen berechnet:

$$\frac{\text{Durchmesser der Herzzellwand in der Diastole} - \text{Durchmesser der Herzzellwand in der Systole}}{\text{Durchmesser der Herzzellwand in der Diastole}} \times 100\%$$

Für die Berechnungen der prozentualen systolischen Verkürzungsfraction der *CAP^{49e}*-Larven wurden nur die Werte der Tiere mit reduzierter Kontraktilität des Dorsalgefäßes verwendet und dargestellt.

2.2.4 Histologische Methoden

2.2.4.1 Formaldehydfixierung von Embryonen

Embryonen wurden auf der Ablageplatte mit 50 % Danklorix-Lösung (Colgate-Palmolive) für 2 – 3 Minuten unter Beobachtung mittels eines Binokulars dechorionisiert und anschließend in einem feinmaschigen Nylonsieb mit Wasser gewaschen. Die Embryonen wurden daraufhin mit einem Pinsel vorsichtig in ein Szintillationsgefäß mit Fixierlösung überführt und für 30 Minuten bei 300 rpm und Raumtemperatur geschüttelt. Die untere Phase wurde komplett entfernt und 5 ml Methanol hinzugegeben. Durch sofortiges Schütteln für die Dauer von 1 Minute wurden die Embryonen devitellinisiert und sinken nach unten. Die Fixierlösung sowie nicht devitellinisierte Embryonen wurden komplett entfernt und die devitellinisierten

Embryonen 2-mal mit Methanol gewaschen. Die Embryonen wurden anschließend bei -20 °C gelagert.

Fixierlösung: 5 ml Heptan, 4,5 ml 1x PBS pH 7,4, 500 µl 37 % Formaldehyd

2.2.4.2 Antikörper-Fluoreszenzfärbung von Embryonen

Die fixierten und in Methanol gelagerten Embryonen wurden zunächst in 50 % Methanol in PBT gewaschen. Es folgten drei 10 bis 15- minütige Waschschrte mit PBT. Anschließend wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen mit einer 30 bis 60-minütigen Inkubation in 5 % BSA in PBT abgeblockt. Die Embryonen wurden mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C auf einem Taumler inkubiert. Nach fünf 10 bis 15-minütigen Waschschrten mit PBT erfolgte die Inkubation der Embryonen mit dem sekundären Antikörper entweder für 3 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C auf dem Taumler. Es folgten fünf 10 bis 15-minütige Waschschrte mit PBT sowie die DNA-Färbung mittels Hoechst-Farbstoff. Die Embryonen wurden in 4 % Propylgallat in 85 % Glycerin eingebettet. Die Fluoreszenz- gefärbten Embryonen wurden mit dem *DeltaVision* Mikroskopsystem mithilfe der Software *SoftWoRx* aufgenommen. Die Bildbearbeitung erfolgte mit dem *SoftWoRx* Programm und Photoshop CS3 (Adobe).

1x PBT: 1x PBS, 0,1 % Triton X-100

2.2.4.3 Signalverstärkung mit dem TSA™ Fluorescein System

Die direkte Fluoreszenzfärbung führte bei manchen primären Antikörpern nur zu einem schwachen Signal. Mithilfe des TSA™ Fluorescein Systems (Perkin Elmer) konnte eine Verstärkung des Fluoreszenzsignals ermöglicht werden. Die Färbung wurde bis zur Zugabe des zweiten Antikörpers, wie in 2.2.4.2 beschrieben, durchgeführt. Die Embryonen wurden 2 h mit einem biotinylierten sekundären Antikörper bei RT auf dem Taumler inkubiert. Nach drei 30-minütigen Waschschrten mit 1x PBT inkubierte man die Embryonen für 1 h bei RT mit Streptavidin-HRP (1:100). Die Embryonen wurden dann dreimal für 30 Minuten mit 1x PBT gewaschen und anschließend für 30 Minuten mit dem TSA-Gemisch (1 µl Fluorescein + 100 ml Amplifikationspuffer) bei RT auf dem Taumler inkubiert. Abschließend folgten zwei kurze und drei 30-minütige Waschschrte mit 1x PBT und die Einbettung in 4 % Propylgallat in 85 % Glycerin.

2.2.4.4 *In situ* Hybridisierung von Embryonen nach (Wilk et al., 2010)

2.2.4.4.1 Herstellung von Digoxigenin-markierten RNA *in situ* Proben

Für die Herstellung von Digoxigenin-markierten RNA *in situ* Proben wurden 150 - 600bp große Exonfragmente der entsprechenden Kandidatengene mittels genspezifischen Primern (siehe Anhang Tabelle 17) aus genomischer Fliegen-DNA amplifiziert und in den pGEM®-T Easy Vektor subkloniert. Über Restriktionsverdau wurde die Orientierung des Amplikons ermittelt. Es folgte eine zweite PCR Reaktion mit T7 und SP6 Primern und die Gelextraktion des entsprechenden Fragments. Nun wurde durch *in vitro* Transkription entweder mit der T7 oder SP6 RNA-Polymerase entsprechend der Orientierung des Amplikons die antisense RNA-Probe und für bestimmte Gene auch die sense RNA-Probe synthetisiert. Für die *in vitro* Transkription wurde den Herstellerangaben (Roche und Thermo Fisher Scientific) gefolgt. Die Qualität und Quantität der Dig-markierten RNA-Proben wurde mit einem nativen Agarosegel und Dot Blot ermittelt.

Tabelle 13 Reaktionsansatz *in vitro* Transkription

Komponenten	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
5x Transkriptionspuffer	2 µl	1 x
Dig-NTP-Mix (10 mM ATP, 10 mM GTP, 10 mM CTP, 6,5 mM UTP, 3,5 mM Dig-UTP)	1 µl	0,2 mM für ATP, GTP, CTP 0,13 mM UTP 70 µM Dig-UTP
Ribolock™ RNase Inhibitor	1 µl	40 U/Reaktion
RNA Polymerase	1 µl	20 U/Reaktion
<i>A. bidest</i>	variabel	-
PCR Produkt	variabel	250-300 ng/Reaktion
Endvolumen	10 µl	-

2.2.4.4.2 Proteinase K Verdau und Prähybridisierung der Embryonen

In Methanol fixierte Embryonen wurden schrittweise rehydriert (75 %, 50 %, 25 % Methanol in PBT) und 5-mal mit 1x PBT gewaschen. Die Embryonen wurden anschließend mit 2,67 µg/ml Proteinase K für 13 Minuten bei RT auf dem Schüttler und anschließend für eine Stunde auf Eis verdaut. Der Proteinase K Verdau wurde durch drei 5-minütige Waschschriffe mit 2 mg/ml Glycin in PBT abgestoppt, gefolgt von zwei 7-minütigen Waschschriffen mit 1x PBT. Die Embryonen wurden anschließend für 25 Minuten mit 3,7 % Formaldehyd in PBT fixiert. Die Fixierlösung wurde durch 5 Waschschriffe mit 1x PBT entfernt. Nun wurden die Embryonen schrittweise in Hybridisierungspuffer überführt. Dabei wurde zunächst ein 10-minütiger Waschschriff in 50 % Hybridisierungspuffer: 50 % PBT durchgeführt, gefolgt von einem weiteren 10-minütigen Waschschriff in 100 % Hybridisierungspuffer. Die Embryonen wurden schließlich in 100 % Hybridisierungspuffer prähybridisiert. Dafür wurde der Hybridisierungspuffer für 5 Minuten bei 80 °C inkubiert, danach für 5 Minuten auf Eis abgekühlt und unmittelbar zu den Embryonen gegeben. Die Prähybridisierung erfolgte bei 56 °C für mindestens 2 h.

Hybridisierungspuffer: 50 % Formamid, 5x SSC, 100 µg/ml Heparin, 100 µg/ml sonifizierte Lachs-Sperma-DNA, 50 µg/ml Hefe-tRNA, 0.1 % Tween-20, pH 5,5

2.2.4.4.3 Hybridisierung der Embryonen mit den RNA-Sonden

Die RNA-Sonden wurden vor der Hybridisierung für 5 Minuten bei 80 °C inkubiert und dann auf Eis für einige Minuten abgekühlt. Zu jeweils 30 µl Embryonen in 100 µl frischem Hybridisierungspuffer wurden 2-5 µl der RNA-Probe gegeben und mindestens 16 h bei 56 °C hybridisiert. Es folgten 2 Waschschriffe in 100 % Hybridisierungspuffer für 45 – 60 Minuten bei 56 °C. Anschließend wurden bei 56 °C weitere Waschschriffe für 15 Minuten mit 50 % Hybridisierungspuffer und 25 % Hybridisierungspuffer in PBT durchgeführt. Bei Raumtemperatur wurden die Embryonen noch 5-mal für 10 Minuten mit 1x PBT gewaschen. Unspezifische Antikörperbindungen wurden durch das Inkubieren der Embryonen mit 5 % Milchpulver in PBT für eine Stunde abgeblockt. Die Inkubation mit einem anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase gekoppelten Antikörper erfolgte entweder über Nacht bei 4 °C oder für 3 h bei RT. Ungebundener Antikörper wurde durch fünf

10 bis 15-minütige Waschschrte mit 1x PBT entfernt. Die Embryonen wurden dann noch 2-mal für jeweils 10 Minuten mit frisch angesetztm AP-Puffer.

AP-Puffer: 0,1 M NaCl, 0,05 M MgCl₂, 0,1 M Tris-HCl pH 9,5, 0,1 % Tween-20

2.2.4.4 Detektion der RNA-Sonden

Die Detektion erfolgte durch das Umsetzten des BCIP Substrats durch die an den anti-Digoxigenin Antikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase. Dafür wurden die Embryonen in eine 24-well Costarschale überführt. Der AP-Puffer wurde entfernt und durch eine AP-Entwicklerlösung ersetzt. Die Farbreaktion wurde bei Raumtemperatur im Dunkeln durchgeführt und durch zweimaliges Waschen mit 1x PBT abgestoppt. Die Embryonen wurden schließlich über eine Ethanolreihe schrittweise dehydriert, in Kanadabalsam eingebettet und die Präparate für zwei Tage bei 65 °C ausgehärtet. Die Bilder wurden mit Nomarski-Optik mit einem Zeiss Axiophot Mikroskopsystem und der ZEN Software dokumentiert. Die Bildbearbeitung erfolgte mit dem ZEN Programm und Photoshop CS3 (Adobe).

AP-Entwicklerlösung: 10 ml AP-Puffer, 45 µl 75 mg/ml NBT, 35 µl 50 mg/ml BCIP

2.2.4.5 Präparation und Färbung von adulten Dorsalgefäßen

Für die Präparation und Färbung von adulten Dorsalgefäße wurden die Fliegen zunächst mit Ether für wenige Minuten betäubt. Es wurden die Flügel und die Extremitäten der Fliegen vorsichtig mit Pinzetten entfernt. Anschließend fixierte man die Fliegen mit Minutien durch den Thorax auf Sylgardplatten, so dass die dorsale Körperseite nach unten gerichtet war. Die Fliegen wurden mit 1x PBS überschichtet und das Abdomen mit einer chirurgischen Augenschere (Micromed © Medizintechnik GmbH, Artikelnr.: 381-061-018) geöffnet. Das Dorsalgefäß wurde von den anderen Organen wie dem Darm, den Malphigischen Gefäßen und den Gonaden freipräpariert und mit 3,7 % Formaldehyd in PBS bei 4 °C für 0,5 – 1 h auf dem Taumler fixiert. Danach wurden die Abdomen mit den Dorsalgefäßen in ein Eppendorfgefäß überführt und dreimal für 10 Minuten mit 1x PBT gewaschen. Die Dorsalgefäße wurden nun für 30 Minuten mit 5 % BSA in PBT geblockt und dann über Nacht bei 4 °C mit primären Antikörpern auf dem Taumler inkubiert. Nach weiteren drei 15-minütigen Waschschrten wurden die Dorsalgefäße entweder mit den zugehörigen sekundären Antikörpern und/oder TRITC-konjugiertem Phalloidin

(Sigma, 0.3 µg/ml) für 2 h bei Raumtemperatur gefärbt. Ungebundener Antikörper wurde durch drei 15-minütige Waschschrte mit 1x PBT entfernt und die Abdomen mit den Dorsalgefäßen in 4 % Propylgalat in 85 % Glycerin eingebettet. Dabei wurde mit Hilfe von 18x18 Deckgläsern auf dem Objektträger eine Brücke gebaut und dazwischen dann das Abdomen mit einem 24x24 Deckglas eingebettet. Die Bilder wurden mit dem *DeltaVision* Mikroskopsystem und mithilfe der *SoftWoRx* Software aufgenommen. Die Bildbearbeitung erfolgte mit dem *SoftWoRx* Programm und Photoshop CS3 (Adobe).

2.2.4.6 Präparation und Färbung von larvalen Dorsalgefäßen

Für die Präparation der larvalen Dorsalgefäße wurden die Larven mit Minutien anterior zwischen den Mundhacken und posterior zwischen den posterioren Spirakeln auf Sylgardplatten immobilisiert, so dass die dorsale Körperseite nach unten gerichtet war. Die Larve wurde nun entlang der ventralen Körperachse mit einer chirurgischen Augenschere aufgeschnitten. Mit weiteren Minutien wurde die Epidermis seitlich aufgespannt und das larvale Dorsalgefäß von den anderen Organen freipräpariert. Die Fixierung und Färbung der larvalen Dorsalgefäße erfolgte dann wie in dem Kapitel 2.2.4.5 beschrieben wurde.

2.2.4.7 Histologische Schnitte und Elektronenmikroskopie

Die Embryos wurden wie in (Soplop et al., 2009) beschrieben, fixiert. Dafür wurden 2 ml Fixierlösung bestehend aus 12,5 % Glutaraldehyd in 50 mM Cacodylatpuffer in ein Szintillationsgefäß gegeben, mit 8 ml Heptan versetzt und stark geschüttelt. Nach Separation der beiden Phasen wurde die mit Glutaraldehyd gesättigte, obere Heptan-Phase (Fixierlösung) in ein frisches Szintillationsgefäß überführt. Dechorionisierte Embryonen wurden anschließend zu der Fixierlösung gegeben und für 1,5 h bei 4 °C auf dem Taumler fixiert. Die Embryonen wurden dann mit einer Pasteurpipette in eine mit doppelseitigen Klebeband ausgekleideten Petrischale überführt und mit 1x PBS überschichtet. Embryonen des Embryonalstadiums 16 wurden nach ihrem Genotyp und ihrer Darmmorphologie ausgewählt und mit einer Wolframnadel per Hand devitellinisiert. Die devitellinisierten Embryonen wurden in ein Eppendorfgefäß überführt, mit 0,1 M Cacodylatpuffer gewaschen und für 1 h mit 1 % Osmiumtetroxid gefärbt. Abschließend wurden die Embryonen in einer abgestuften Ethanolreihe und

Propylenoxid dehydriert und in Poly/BedR 812 (Polysciences, Inc., Eppelheim) eingebettet.

Die Semidünnschnitte von 1 µm wurden mit einem Leica Ultracut S Ultramikrotom hergestellt und mit Toluidinblau für 3 Minuten bei 70 °C gefärbt. Die Bildaufnahme erfolgte mit einem Zeiss Axiophot Mikroskopiesystem.

Die Ultradünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert und mit einem FEI Morgagni Elektronenmikroskop untersucht. Digitale Bilder wurden mit einem Morada CCD-Kamera und der iTEM Software (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster) aufgenommen. Die Bildbearbeitung erfolgte mit Photoshop CS3 (Adobe).

Dieser Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Bettina Purfürst in der Arbeitsgruppe Elektronenmikroskopie am MDC Berlin, Buch durchgeführt.

2.2.5 Mikroskopie

Wenn nicht anders vermerkt, wurden lichtmikroskopische Aufnahmen mit dem Zeiss Axiophot Mikroskopsystem und der ZEN Software aufgenommen. Die Bildbearbeitung erfolgte mit dem ZEN Programm und mit Photoshop CS3 (Adobe).

Wenn nicht anders beschrieben, wurden Fluoreszenz-gefärbte Embryonen mit dem *DeltaVision* Mikroskopsystem und der Software *SoftWoRx* dokumentiert. Die Rohdaten wurden zur Verbesserung der Bildqualität deconvolviert. Die weitere Bildbearbeitung wurde mit dem *SoftWoRx* Programm und mit Photoshop CS3 (Adobe) vorgenommen.

Die in Abbildung 16 dargestellten Z-Ebenen, wurden mit der *Orthogonal Viewer* Funktion des *SoftWoRx* Programms erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Kandidaten *in situ* Screen zur Identifizierung neuer an der Herzentwicklung in *Drosophila melanogaster* beteiligter Gene

3.1.1 Auswahl der Kandidatengene für den *in situ* Screen

In einem ersten Teil meiner Arbeit führte ich eine systematische Studie der Expressionsmuster von 101 *Drosophila* Kandidatengenen mittels *in situ* Hybridisierungen durch, um neue Gene zu identifizieren, die im Dorsalgefäß exprimiert sind. Ausgangspunkt dafür war eine Transkriptomanalyse während der Herzschaubildung bei dem Zebrafisch *Danio rerio*, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Salim Seyfried durchgeführt wurde (Priller, 2011). Die Kandidaten für meine Analyse wählte ich aus einer Liste von Genen, die während der Herzmorphogenese des Zebrafisches *Danio rerio* stark im Herzen exprimiert werden. Als Auswahlkriterien benutzte ich zudem den Grad der Konservierung orthologer Gene in *Drosophila*. Weitere Voraussetzungen waren, dass eine Herzfunktion dieser Gene bisher nicht beschrieben war und, dass solche Gene potenziell medizinisch relevant waren. In der Tabelle 14 sind die Gene dargestellt, deren Expressionsmuster mittels *whole mount in situ* Hybridisierungen untersucht wurden. Für die Durchführung der Expressionsanalysen wurden antisense RNA-Proben synthetisiert und mit Embryonen von wildtypischen Fliegen (Referenzstamm *Oregon R*) hybridisiert. Als Kontrollen wurden antisense RNA-Proben der bereits gut charakterisierten, herzspezifischen Gene *tinman* und *Dorsocross* mitgeführt. Die Expressionsmuster aller analysierten Kandidatengene wurden dokumentiert und mit der BDGP-Datenbank (<http://insitu.fruitfly.org/cgi-bin/ex/insitu.pl>) verglichen. Im Anhang sind die Expressionsdaten tabellarisch im Vergleich zu den in der BDGP-Datenbank vorhandenen Expressionsdaten dargestellt (Tabelle 18).

3.1.2 Zusammenfassung der *in situ* Screen Ergebnisse

Von den 101 Kandidatengenen zeigten 20 Gene eine Expression im embryonalen Dorsalgefäß von *Drosophila melanogaster*. Diese sind in der Tabelle 14 aufgelistet. Die Tabelle zeigt auch einen Vergleich der in der BDGP-Datenbank gelisteten Expressionsmuster und der in dieser Arbeit erhaltenen *in situ* Expressionsdaten.

Tabelle 14 Darstellung der 101 Kandidatengene des *in situ* Screens

FlyBase ID	Dm Symbol	Dr Symbol	Hs Symbol	FlyBase ID	Dm Symbol	Dr Symbol	Hs Symbol	FlyBase ID	Dm Symbol	Dr Symbol	Hs Symbol
FBgn0013995	Calx	slc8a1b, slc8a2b, slc8a4a	SLC8A1; SLC8A2; SLC8A3	FBgn0016076	vri	nfil3	NFIL3	FBgn0033215	CG1942	zgc:101757	MOGAT3
FBgn0023180	Orc6	orc6	ORC6L	FBgn0020391	Nrk	musk	MUSK	FBgn0005613	Sox15	sox7	SOX7
FBgn00264753	Rgk1	rrad	RRAD	FBgn0039055	CG4656	rassf6	RASSF6	FBgn0262871	CG5319	LOC556897	BTBD6
FBgn0035008	CG3494	lrrc10	LRRC10	FBgn0260960	Baldspot	elov6	ELOVL6	FBgn0037847	SelR	msrb3	MSRB3
FBgn0039882	CG11576	zgc:136909	C20orf54	FBgn0004429	LysP	lyz	LYZL6;LYZL2;LYZL1;LYZL4;SPACA5;SPACA5B	FBgn0250753	exba	bzw2	BZW2
FBgn0259678	sqa	mylk2; mylk3	MYLK2, MYLK3	FBgn0032243	Klp31E	A2RV26_DANRE	KIF21A	FBgn0013987	MAPK-Ak2	zgc:158342	MAPKAPK3
FBgn0263006	Ca-P60A	atp2a1a; atp2a2; atp2a3	ATP2A1; ATP2A2; ATP2A3	FBgn0052423	shp	rbms3	RBMS3	FBgn0036376	CG10743	si:dkey-207j16.2	PPFIBP1
FBgn0002773	Mlc2	myl7	MYL7	FBgn0034793	asrij	ociad2	OCIAD2	FBgn0041210	HDAC4	hdac9b	HDAC9
FBgn0035102	CG7049	sumf2	SUMF2;PHKG1	FBgn0015402	ksr	si:busm1-122b7.1	KSR1	FBgn0085220	CG34191	ufm1	UFM1
FBgn0051163	SKIP	samsn1a	SAMSN1	FBgn0250785	szar	mpp2b	MPP2	FBgn0031081	Nep3	zgc:154079	ECE1
FBgn0031850	Tsp	thbs3b	THBS3	FBgn0014859	Hr38	nr4a1	NR4A1	FBgn0005677	dac	dacha	DACH2
FBgn0050340	CG30340	ednra	EDNRA	FBgn0051721	Trim9	trim55b	TRIM55	FBgn0029820	CG16721	zgc:73347	TCP11L2
FBgn0004882	orb	cpeb1a; cpeb1b	CPEB1	FBgn0037240	Cont	zgc:55318	CNTN5	FBgn0263395	CG7097	map4k2l	MAP4K2
FBgn0004169	up	tnnt2a	TNNT2	FBgn0004864	hop	jak1	JAK1	FBgn0261811	pico	LOC562032	GRB10
FBgn0265434	zip	myh11	MYH11	FBgn0015831	Rtnl2	rtn2b	RTN2	FBgn0039924	CG17471	LOC560360	PIP5K2A
FBgn0004687	Mlc-c	myl6	MYL6	FBgn0004507	GlyP	pygb	PYGB	FBgn0010620	Sip1	slc9a3r2	SLC9A3R1
FBgn0038037	Cyp9f2	cyp3c1l2	CYP3A5;CYP3A4;CYP3A7;CYP3A43	FBgn0036505	CG7945	bag2	BAG2	FBgn0025741	plexA	plxna4	PLXNA4
FBgn0030889	CG15373	casc1	CASC1	FBgn0013343	Syx1A	zgc:101111	STX2	FBgn0250788	beta-Spec	sptb	SPTB
FBgn0263995	cpo	rbpms2	RBPMS2	FBgn0029105	alpha-catenin-related	si:ch211-254e15.1	CTNNAL1	FBgn0263391	hts	add3a	ADD3
FBgn0031150	bves	popdc1	BVES	FBgn0035390	CG1893	plscr3a	PLSCR1;PLSCR2;PLSCR4	FBgn0052528	CG32528	parvaa	PARVA
FBgn0029879	APC7	atp2a2a	ANAPC7	FBgn0032796	CG10188	arhgef1	ARHGEF2	FBgn0039858	CycG	ccng2	CCNG2
FBgn0033504	CAP	LOC100002756; SORBS2a; SORBS2b;SORBS3	SORBS1; SORBS2; SORBS3	FBgn0014073	Tie	tie1	TIE1	FBgn0039465	Tsp97E	tspan13	TSPAN13
FBgn0031858	CG17378	zgc:91860	KIAA0513	FBgn0259482	CG4946	mobkl2c	MOBKL2C	FBgn0036819	CG6856	dtnbp1b	DBNDD2
FBgn0265935	coro	coro1a	ORO1A;CLDN4;CLDN9.2;FTHL17	FBgn0032129	jp	jph2	JPH2	FBgn0027865	Tsp96F	cd9a	CD9
FBgn0030449	Fer3HCH	zgc:109934	FTH1;FTMT;AJ23932	FBgn0024238	Fim	lcp1	LCP1	FBgn0053208	MICAL	micall2	MICALL1
FBgn0053519	Unc-89	spg	SPEG	FBgn0003514	sqh	myl9	MYL9	FBgn0025777	homer	homer1	HOMER1
FBgn0039380	CG5890	kcnp1b	KCNIP1	FBgn0005536	Mbs	ppp1r12a	PPP1R12A	FBgn0037720	CG8312	zgc:77057	FAM43A
FBgn0264711	CG33291	A0PJR1_DANRE	ABTB2	FBgn0031418	CG3609	dhdh1	DHDH	FBgn0010225	Gel	capg	CAPG
FBgn0038365	CG9593	angpt1	ANGPT1	FBgn0261387	CG17528	dclk1	DCAMKL1	FBgn0032961	CG1416	ahsa1	AHSA1
FBgn0032228	CG5367	ctsk	CTSK	FBgn0028550	A3-3	zgc:92851	JDP2	FBgn0003090	pk	prickle2	PRICKLE2
FBgn0264357	SNF4Agamma	zgc:153329	PRKAG2	FBgn0032409	Ced-12	elmo1	ELMO1	FBgn0002524	lace	sptlc2	SPTLC2
FBgn0265991	Zasp52	ldb3a	LDB3	FBgn0005638	slbo	cebpa	CEBPA	FBgn0036516	CG7656	cdc34a	CDC34
FBgn0030529	Clic	clic2	CLIC2	FBgn0027788	Hey	hey2	HEY2	FBgn0020912	Ptx1	pitx2	PITX2
FBgn0035437G12AA3.1	CG11526	fam40a	FAM40A	FBgn0033028	CG11665	slc16a3	SLC16A3				

Gezeigt ist die FlyBase ID, das Gensymbol in *Drosophila* (*Dm*) sowie die Gensymbole der entsprechenden Orthologe im Zebrafisch (*Dr*) und im Menschen (*Hs*).

Die Kandidatengene, die im embryonalen Dorsalgefäß von *Drosophila* exprimiert werden, sind gelb hervorgehoben.

In der BDGP-Datenbank war für die Gene *CAP*, *ZASP52* und *zipper* bereits eine Expression im Dorsalgefäß dokumentiert, die ich mit meiner Arbeit bestätigen konnte (Abbildung 7A,R,S). Darüber hinaus war es mir möglich die Expression im embryonalen Dorsalgefäß für 17 weitere Gene erstmalig zu dokumentieren (Abbildung 7). Darunter waren Gene, die neben *zipper* für weitere Untereinheiten des nicht- muskulären Myosin II Hexamers kodieren wie das für die regulatorischen leichten Myosinketten kodierende Gen *sqh* und das für die leichten Myosinketten kodierende Gen *Mlc-c* (Abbildung 7B, D). In diesem Zusammenhang konnte ich auch die Expression von *sqa* (kodiert für die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige MLC-Kinase) und *Mbs* (kodiert für die Myosin-bindende Untereinheit der Myosin-Phosphatase) im embryonalen Dorsalgefäß zeigen (Abbildung 7C,P).

Zudem konnte ich unter anderem die Expression von Genen im Dorsalgefäß nachweisen, die funktionell mit dem Aktinzytoskelett assoziiert sind (*Fim*, *Sip1*, *pico*; Abbildung 6Q und Abbildung 7L,M) oder für Calciumionenkanäle bzw. –austauscher kodieren (*Ca-P60A* und *Calx*; Abbildung 7E,H).

Tabelle 15 Übersicht der 20 Gene, die im embryonalen Dorsalgefäß exprimiert werden

<i>Dm</i> Symbol	Krankheiten OMIM (OMIM-Nummer)	<i>in situ</i> Expression (BDGP-Datenbank)	<i>in situ</i> Expression (diese Arbeit)
A3-3	keine Daten	maternal, dorsolaterales sensorisches System, ubiquitär, ventraler Nervenstrang, sensorischer Komplex der Maxille und des Labiums	maternal, ventraler Nervenstrang, Gehirn, ubiquitär, Dorsalgefäß
Calx	keine Daten	maternal, Ektoderm	maternal, ubiquitär, Gehirn, Hinterdarm, Dorsalgefäß
CAP	Septische Granulomatose (233710)	viszerale Muskulatur, Anlagen sensorisches Nervensystem, dorsolaterales sensorisches System, Anlagen ventrales	viszerale Muskulatur, Dorsalgefäß, Garlandzellen, Pharynxmuskulatur, Mitteldarm, Hinterdarm

Dm Symbol	Krankheiten OMIM (OMIM-Nummer)	<i>in situ</i> Expression (BDGP-Datenbank)	<i>in situ</i> Expression (diese Arbeit)
		sensorisches System, Dorsalgefäß, Garlandzellen, Kopfepidermis	
Ca-P60A	Brody-Myopathie (601003); Morbus Darier (124200)	maternal, ubiquitär, Vorderdarm, Mitteldarm, Hinterdarm, Speichel- drüsen, somatische Muskulatur, viszerale Muskulatur, Pharynxmuskulatur, dorsaler Prothorax	maternal, ubiquitär, Dorsalgefäß, somatische Muskulatur
CG11526	keine Daten	keine Daten	ubiquitär, Gehirn, Hinterdarm, Dorsalgefäß
CG16721	keine Daten	maternal, schwach ubiquitär	maternal, ubiquitär, Dorsalgefäß
cpo	keine Daten	dorsolaterales sensorisches System, Anlagen sensorisches Nervensystem, sensorische Struktur des Vorderdarms, sensorischer Komplex der Maxille und des Labiums, sensorisches System Kopf, sensorisches antennales Organ, Ringdrüse, Kopfepidermis	Dorsalgefäß, dorsolaterales sensorisches System, Ringdrüse, Kopfepidermis
Fim	keine Daten	maternal, Mesoderm	Amnioserosa, ventraler Nervenstrang, Gehirn, Mesoderm, Dorsalgefäß, Hinterdarm, Cypeolabrum, viszerale Muskulatur

Dm Symbol	Krankheiten OMIM (OMIM-Nummer)	in situ Expression (BDGP-Datenbank)	in situ Expression (diese Arbeit)
HDAC4	Brachydaktylie mentales Retardierungssyndrom (600430)	keine Daten	schwache Expression in: Mitteldarm, Hinterdarm, Vorderdarm, Dorsalgefäß
Mbs	keine Daten	Ösophagusmuskulatur, dorsaler Prothorax, Pharynxmuskulatur, viszerale Muskulatur, somatische Muskulatur	ubiquitär, Dorsalgefäß
Mlc-c	familiäre hypertrophe Kardiomyopathie (608751)	maternal, stark ubiquitär	maternal, ubiquitär, Dorsalgefäß, somatische Muskulatur, Hinterdarm, Pharynxmuskulatur,
orb	keine Daten	maternal, Gonaden, Polzellen, Gehirn, ventraler Nervenstrang	maternal, ubiquitär, Polzellen, Dorsalgefäß
pico	keine Daten	keine Daten	Dorsalgefäß, Vorderdarm, Hinterdarm
pk	Progressive Myoklonusepilepsien (613832)	keine Daten	Gehirn, ventraler Nervenstrang, Cypeolabrum, Hinterdarm, Dorsalgefäß
Sip1	Nephrolithiasis/Osteoporos e (612287)	Vorderdarm, Ösophagus, Epipharynx, Hinterdarm, ventrale und dorsale Epidermis, Atrium, Kopfepidermis, Hypopharynx	ubiquitär, Dorsalgefäß, Ösophagus, Epipharynx, Hypopharynx, Hinterdarm, Atrium
slbo	akute myeloische Leukämie (601626)	Kopfepidermis, posteriore Spiculae, ventrale und dorsale Epidermis	posteriore Spiculae, Epidermis, Dorsalgefäß
sqa	familiäre hypertrophe Kardiomyopathie	somatische Muskulatur	somatische Muskulatur, Dorsalgefäß, Hinterdarm,

Dm Symbol	Krankheiten OMIM (OMIM-Nummer)	<i>in situ</i> Expression (BDGP-Datenbank)	<i>in situ</i> Expression (diese Arbeit)
	(192600); chronische myeloische Leukämie; Aortenaneurysma (613780)		Gehirn
sqh	familiäre hypertrophe Kardiomyopathie (608758)	maternal, ubiquitär	maternal, ubiquitär, Vorderdarm, Hinterdarm, Dorsalgefäß
Zasp52	dilatative Kardiomyopathie (601493); Linksventrikuläre 'Noncompaction' (LVNC), mit oder ohne dilatative Kardiomyopathie (601493); myofibrilläre Myopathie (609452)	maternal, Mitteldarm, Epipharynx, Dorsalgefäß, Hypopharynx, somatische Muskulatur, schwach ubiquitär	maternal, ubiquitär, Mitteldarm, Hinterdarm, Dorsalgefäß
zip	Epstein-Syndrom (153650); Fechtner-Syndrom (153640); May-Hegglin Anomalie (155100); Sebastian-Syndrom (605249); Vorhofseptumdefekt (614089); Linksventrikuläre 'Noncompaction' (LVNC), (613426); dilatative Kardiomyopathie (613252)	maternal, Mitteldarm, Dorsalgefäß, Muskelsystem, Kopfeperidermis	maternal, Mitteldarm, Dorsalgefäß, Muskelsystem, Kopfeperidermis

Gezeigt sind die Kandidatengene, die im embryonalen Dorsalgefäß exprimiert sind, sowie die OMIM Krankheiten und die Expressionsdaten der BDGP-Datenbank und dieser Arbeit.

Von allen untersuchten Genen zeigte *CAP* die stärkste Expression im Dorsalgefäß. Daraufhin wurde im zweiten Teil meiner Arbeit die Rolle von *CAP* bei der Herzentwicklung analysiert.

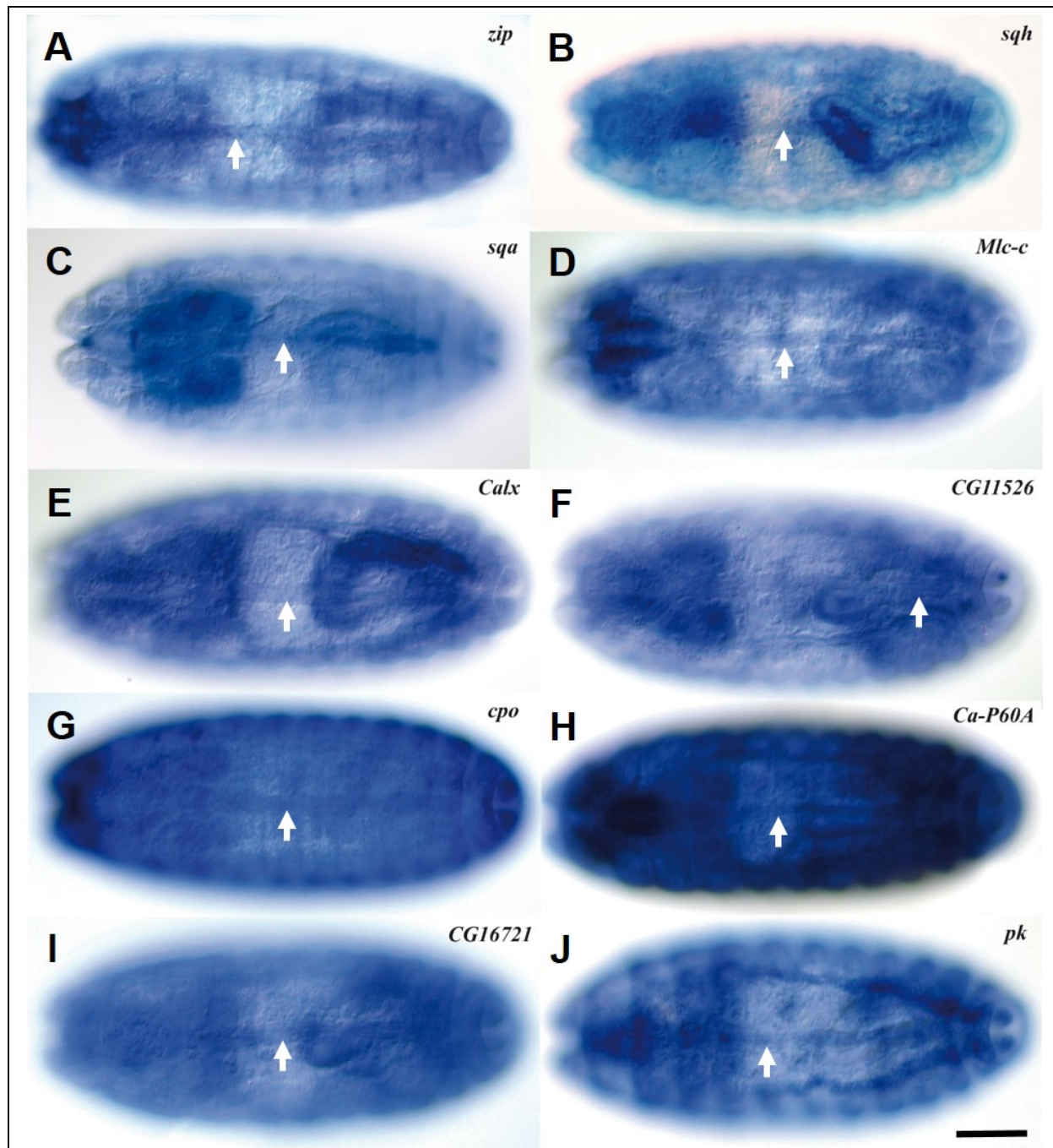
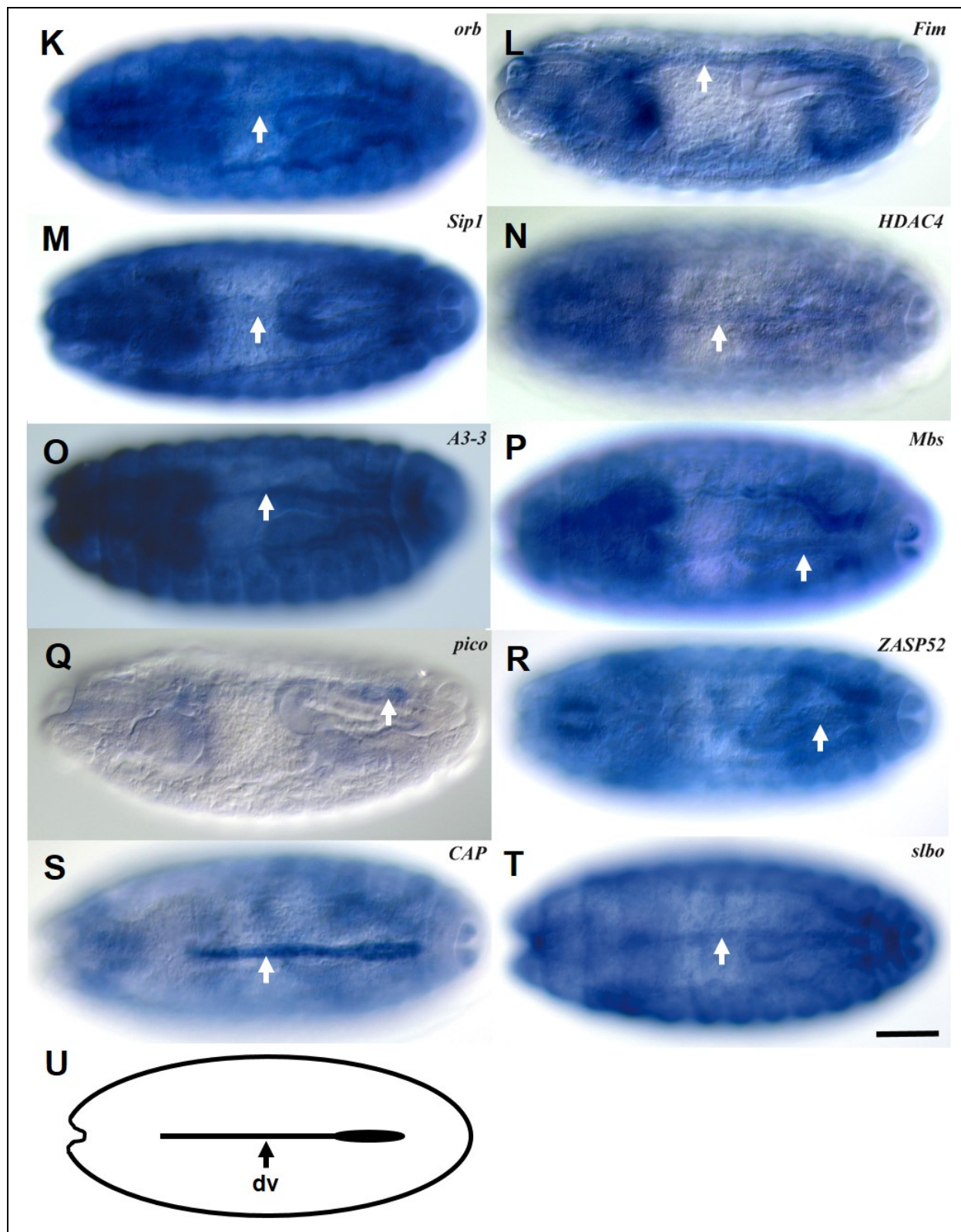


Abbildung 7 Expression der im Dorsalgefäß exprimierten Kandidatengene.

(A-T) Wildtyp-Embryonen des Referenzstammes *Oregon R* wurden mit Digoxigenin-markierten genspezifischen antisense RNA-Proben hybridisiert. Eine sense RNA-Probe wurde als Negativkontrolle mitgeführt (Daten nicht gezeigt). Dargestellt sind die *whole mount in situ* Hybridisierungen der 20 Kandidatengene (Embryonalstadium 16), die im embryonalen Dorsalgefäß exprimiert sind. Mit einem Pfeil ist das embryonale Dorsalgefäß („*dorsal vessel*“: *dv*) markiert. Maßstab: 50 µm. (U) Schematische Darstellung eines Embryos im Entwicklungsstadium 16/17. Das Dorsalgefäß (*dv*) ist eingezeichnet.



3.2 CAP spielt eine wichtige Rolle in der Herzentwicklung von *Drosophila melanogaster*

3.2.1 CAP wird in dem embryonalen Dorsalgefäß exprimiert

Mit Hilfe des in Kapitel 3.1 beschriebenen *in situ* Screens konnte gezeigt werden, dass *CAP* im embryonalen Dorsalgefäß von *Drosophila* exprimiert wird. Das *CAP* Gen wurde auf dem 2R Chromosom (2R:10,269,016...10,307,024 [+]) von *Drosophila* kartiert und kodiert für 23 Transkripte (Abbildung 8). In der BDGP-Datenbank wurde die Expression des *CAP* Gens mehrfach dokumentiert. Dabei wurden immer *in situ* Proben genutzt, die an das letzte Exon des C-terminalen Bereiches der Transkripte bindet. Mit diesen Proben konnten 22 der 23 *CAP*-Transkripte detektiert werden (Abbildung 8). Lediglich die Expression des Transkriptes CAP-P konnte nicht erfasst werden, da diesem Transkript der C-terminale Bereich fehlt. Nach den Daten der BDGP-Datenbank startet die Expression von *CAP* im Stadium 11-12 in den Anlagen der Garlandzellen. In den späteren Embryonalstadien 13-16 wurde *CAP* neben den Garlandzellen auch in der viszeralen Muskulatur, den ventralen und dorsolateralen sensorischen Komplexen, der Kopfepidermis, den Anlagen des sensorischen Nervensystems und dem Dorsalgefäß detektiert. Dabei gab es in der BDGP-Datenbank bisher nur Daten zu der Expression von *CAP* im Dorsalgefäß des Stadiums 16. Aus diesen Daten ergaben sich für meine Arbeit die Fragen, ab wann *CAP* im Dorsalgefäß exprimiert wird und ob sich die Expression des CAP-P Transkriptes von der beschriebenen Expression zeitlich oder gewebsspezifisch unterscheidet. Um diese Fragen zu klären, habe ich eine Digoxigenin-markierte antisense *CAP* RNA-Probe sowie als Kontrolle eine Digoxigenin-markierte sense *CAP* RNA-Probe synthetisiert, die im N-terminalen Bereich binden und auch das CAP-P Transkript detektieren (Abbildung 8).

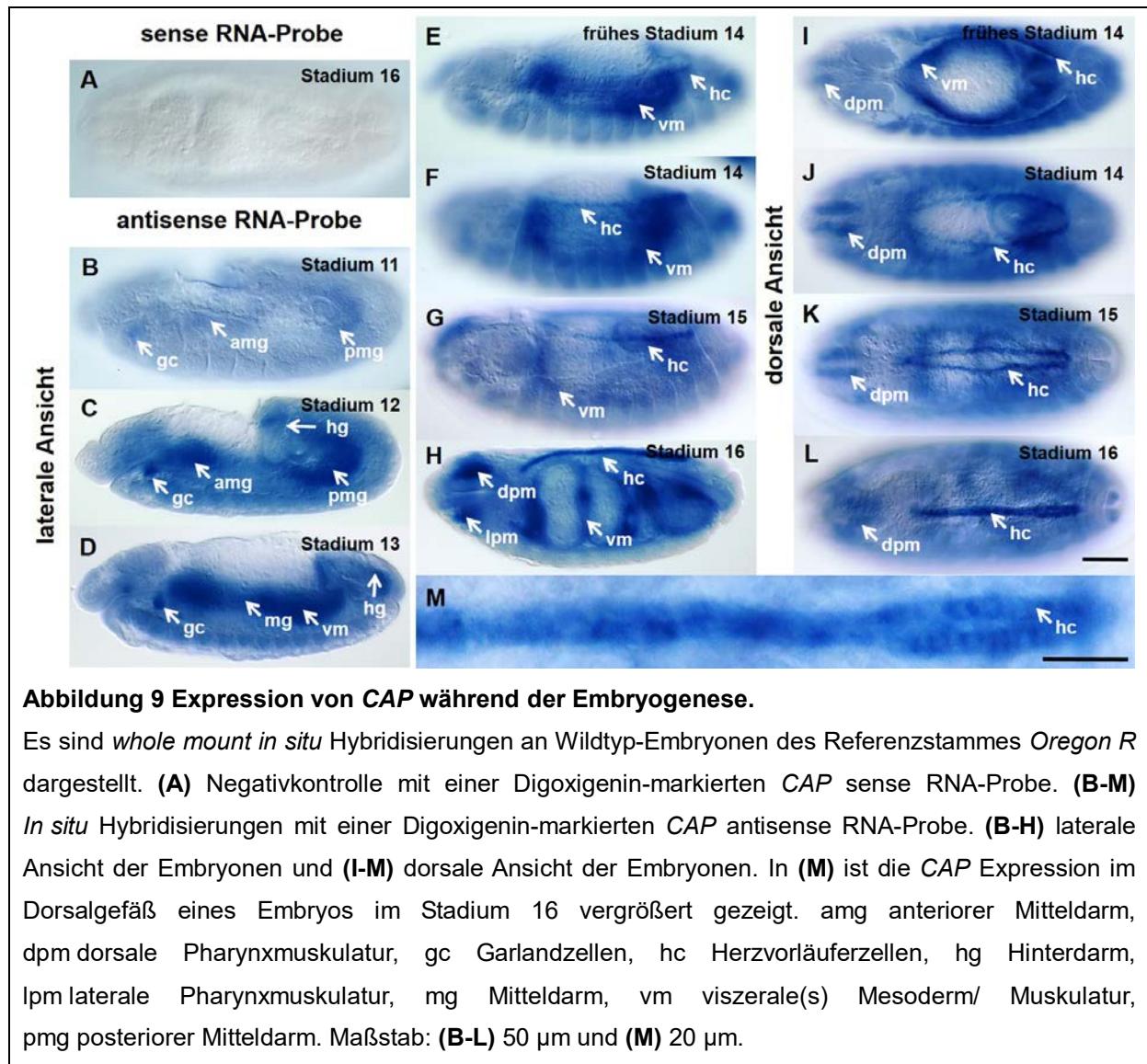


Abbildung 9 Expression von CAP während der Embryogenese.

Es sind *whole mount in situ* Hybridisierungen an Wildtyp-Embryonen des Referenzstammes *Oregon R* dargestellt. (A) Negativkontrolle mit einer Digoxigenin-markierten CAP sense RNA-Probe. (B-M) *In situ* Hybridisierungen mit einer Digoxigenin-markierten CAP antisense RNA-Probe. (B-H) laterale Ansicht der Embryonen und (I-M) dorsale Ansicht der Embryonen. In (M) ist die CAP Expression im Dorsalgefäß eines Embryos im Stadium 16 vergrößert gezeigt. amg anteriorer Mitteldarm, dpm dorsale Pharynxmuskulatur, gc Garlandzellen, hc Herzvorläuferzellen, hg Hinterdarm, lpm laterale Pharynxmuskulatur, mg Mitteldarm, vm viszerale(s) Mesoderm/ Muskulatur, pmg posteriorer Mitteldarm. Maßstab: (B-L) 50 µm und (M) 20 µm.

3.2.2 Das CAP-Protein ist spezifisch im Dorsalgefäß lokalisiert

Um die embryonale Expression des CAP-Proteins genauer untersuchen zu können, wurden zwei Antiseren gegen das CAP-Protein hergestellt. Dabei wurde als Antigensequenz der hochkonservierte C-terminale Bereich gewählt, der in allen bis auf einer CAP-Isoform (CAP-P) vorhanden ist (Abbildung 10). Dafür wurde die Sequenz der Isoform CAP-N bzw. CAP-E verwendet (Abbildung 11A). Die cDNA wurde im Leseraster in den pMH-Vektor kloniert (Gorchakov et al., 2004), der über einen Myc-His-Tag verfügt. Anschließend wurde das Fusionsprotein in *E.coli* Zellen BL21 exprimiert. Die Aufreinigung und Anreicherung des CAP-N Proteins über eine Nickel-Agarose-Säule wurde mittels Coomassie-Färbung und Western Blot verfolgt. Die CAP-Antikörperherstellung erfolgte im Kaninchen und wurde von der Firma

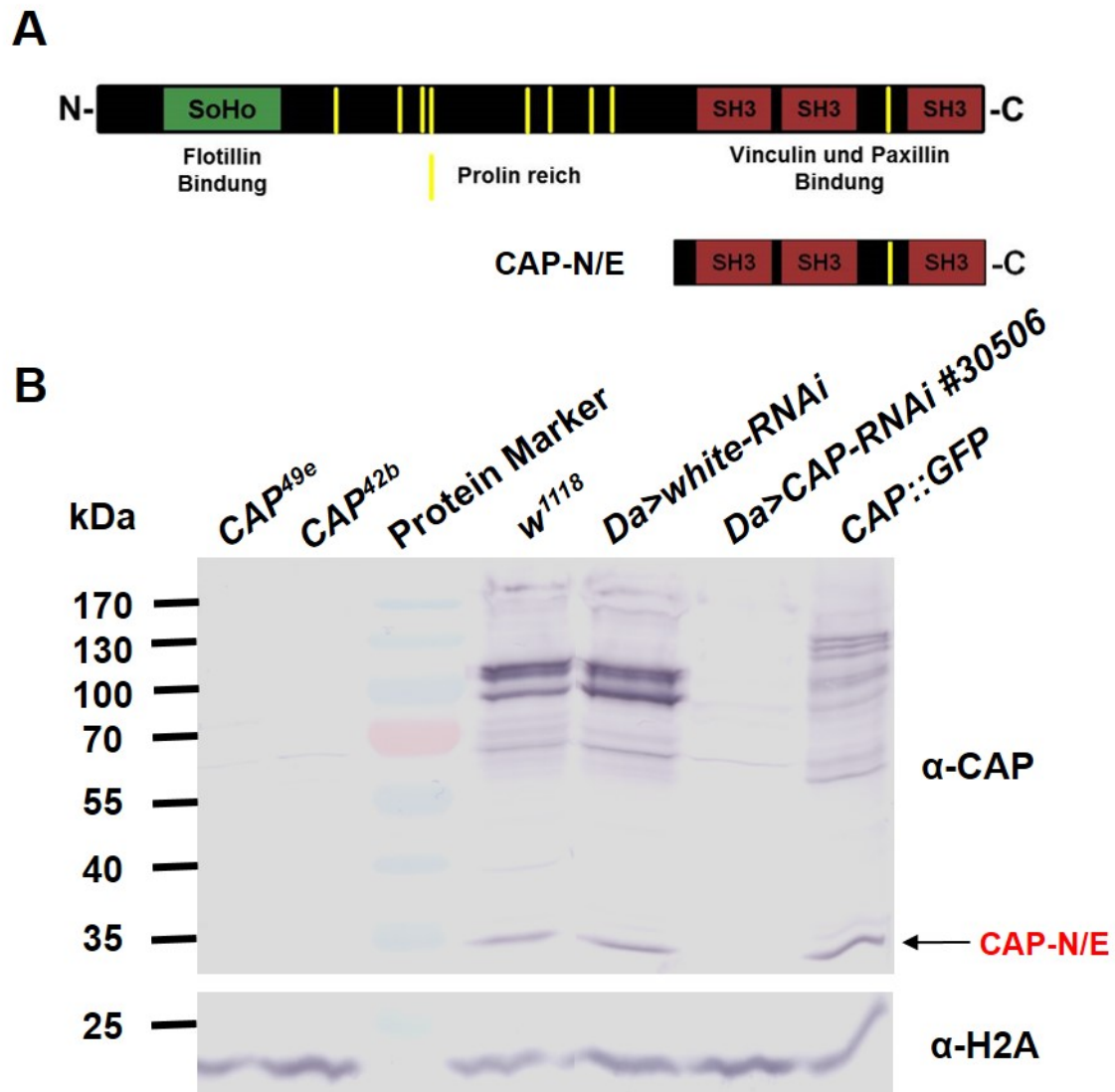


Abbildung 11 CAP-Antikörper

(A) CAP-Proteindomänen sind exemplarisch dargestellt (oben). Zudem ist die CAP-N/E Isoform, deren Sequenz für die Antiserum-Herstellung verwendet wurde, mit den Proteindomänen gezeigt (unten). (B) Proteinextrakte adulter Fliegen der aufgeführten Genotypen wurden mit anti-CAP und anti-H2A (Ladekontrolle) immunoblottet. Der Western Blot zeigt die Spezifität des Antikörpers und die Validierung, der in dieser Arbeit verwendeten Fliegenlinien. Die Bande der CAP-N/E Isoform (35,5 kDa) ist markiert.

In Übereinstimmung mit kürzlich veröffentlichten Daten (Bharadwaj et al., 2013) konnte ich mit den in dieser Arbeit hergestellten polyklonalen Antiseren, CAP in den Muskelanheftungsstellen (MAS), den chordotonalen Organen und im embryonalen Dorsalgefäß nachweisen (Abbildung 12). Ein Ziel meiner Arbeit war es die Proteinexpression von CAP im Dorsalgefäß genauer zu beschreiben. Diesbezüglich führte ich Doppelfärbungen mit einem Antikörper gegen CAP und den Zellmarker Tubulin durch. Dadurch konnte ich zeigen, dass CAP embryonal in den Kardioblasten

lokalisiert ist (Abbildung 12A; der Herzbereich ist vergrößert dargestellt). In Abbildung 12B ist zu sehen, dass CAP innerhalb der Kardioblasten in der Peripherie nahe der Zellmembranen lokalisiert ist. Eine hohe Konzentration des CAP-Proteins ist vor allem an der luminalen Membranseite zu finden.

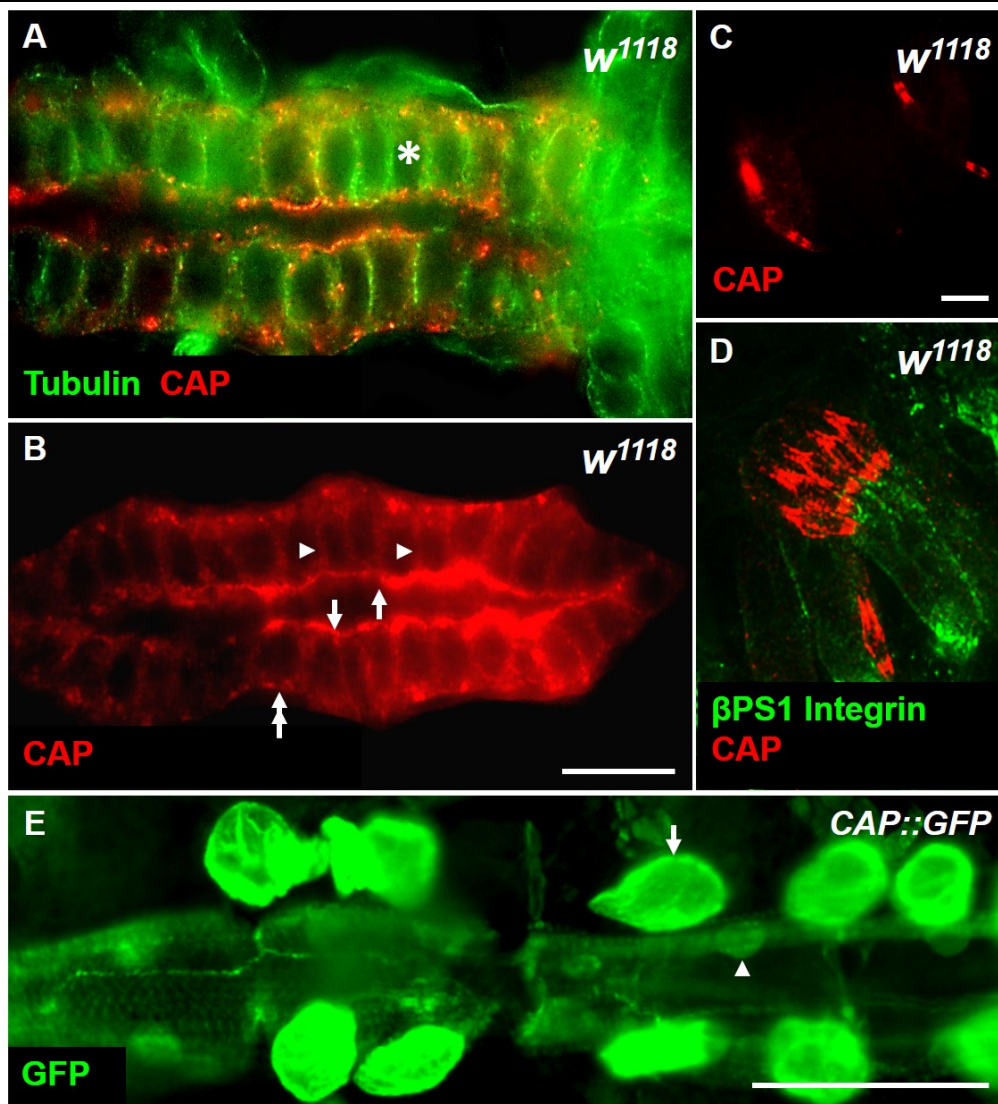


Abbildung 12 CAP ist im Dorsalgefäß lokalisiert.

(A-D) Immunfärbungen an Wildtyp-Embryonen (w^{1118}) gefärbt mit anti-CAP. Maßstab: 10 μ m. (A) Die Doppelfärbung von CAP und dem Zellmarker Tubulin zeigt, dass CAP embryonal ausschließlich in den Kardioblasten (*) lokalisiert ist. Gezeigt ist der Herzbereich. (B) Dargestellt ist die Proteinexpression von CAP in den Kardioblasten (nur der Herzbereich gezeigt). Die Membranbereiche sind gekennzeichnet: lateral (Pfeilköpfe), abluminal (Doppelpfeil) und luminal (Pfeile). (C,D) CAP Expression an den Muskelanheftungstellen (C) und einem chordotonalen Organ (Doppelfärbung mit β PS1 Integrin) (D). Maßstab: 2 μ m. (E) Die Expression von CAP im adulten Dorsalgefäß ist unter Verwendung der FlyTrap Linie $CAP::GFP$ dargestellt. Ein Pfeil markiert die Expression in den Perikardialzellen. Ein Pfeilkopf markiert die Expression im Zellkern der Kardiomyozyten. Maßstab: 100 μ m.

Wie die *CAP::GFP* FlyTrap-Linie zeigt, ist CAP auch im adulten Dorsalgefäß nachweisbar. Interessanterweise kann CAP im adulten Dorsalgefäß im Zellkern der Kardiomyozyten sowie auch in den Perikardialzellen detektiert werden (Abbildung 12E). Eine genaue Beschreibung der Proteinexpression von CAP im larvalen und adulten Dorsalgefäß erfolgt im Kapitel 3.2.9. Zusammengefasst zeigen meine Daten, dass CAP während der gesamten Entwicklung von *Drosophila* im Dorsalgefäß exprimiert ist.

3.2.3 Der Verlust der CAP Funktion führt zu einer anomalen Anzahl und zu Anordnungsdefekten der Kardioblasten

Um die Rolle von CAP während der Herzentwicklung zu untersuchen, analysierte ich die zwei molekular charakterisierten mutanten CAP Allele *CAP^{42b}* und *CAP^{49e}* (Bharadwaj et al., 2013). Beide Linien wurden durch P-Element Mobilisierung, die in einer 2763 bp C-terminalen Deletion (*CAP^{42b}*) und einer 2972 bp C-terminalen Deletion (*CAP^{49e}*) resultierte, hergestellt. Dabei wurden Bereiche der SH3 kodierenden Exone, die für Protein-Protein-Interaktionen wichtig sind, deletiert (Abbildung 13A). Durch Sequenzierung (Daten nicht gezeigt), Western Blot Analyse (Abbildung 11B) und Immunfärbungen (Abbildung 15) konnte ich den *loss-of-function* Charakter beider Allele verifizieren. Jedoch ist hierbei zu beachten, dass die CAP-Antiseren gegen die CAP-N/E Isoformen hergestellt wurden und diese nur den C-terminalen Bereich, den fast alle Isoformen gemein haben, detektieren. Die CAP-P Isoform und mögliche verkürzte CAP-Proteine können demnach nicht nachgewiesen werden (siehe Diskussion 4.2.2.1.1).

Zur Analyse des embryonalen Dorsalgefäßes nutzte ich zunächst den anti-Mef Antikörper, der die Zellkerne aller Kardioblasten anfärbt. Im Wildtyp wandern die bilateral angelegten Zellreihen der Herzvorläuferzellen aufeinander zu und die kontralateralen Kardioblasten fusionieren an der dorsalen Mittellinie. Ich konnte zeigen, dass die CAP-Mutanten im Embryonalstadium 16/17 in 63 % (*CAP^{49e}*) und 64 % (*CAP^{42b}*) Anordnungsdefekte der Kardioblasten aufzeigen (Tabelle 16). Die Anordnungsdefekte treten auch zu einem gewissen Prozentsatz in wildtypischen Fliegen auf, jedoch sind die Defekte in CAP-Mutanten stark erhöht. Interessanterweise konnte ein deutlicher Anordnungsdefekt auch mit der transkriptionellen Herunterregulierung mittels *CAP-RNAi* und der *S59Mef2Gal4*

Treiberlinie erzielt werden (Tabelle 16). Demnach konnten die Anordnungsdefekte mit zwei unabhängigen Systemen (RNAi und mutante Allele) gezeigt werden.

Tabelle 16 Quantifizierung des CAP Herzphänotyps

	Herzdefekte	Mef exprimierende Kardioblasten	Doc exprimierende Kardioblasten
<i>w¹¹¹⁸</i>	0 % (n=52)	103,5 ± 1,2 (n=22)	28,2 ± 0,7 (n=22)
<i>Oregon R</i>	19 % (n=31)	n.d.	n.d.
<i>CAP::GFP</i>	17 % (n=35)	n.d.	n.d.
<i>CAP^{42b}</i>	64 % (n=115)	107,5 ± 2,4 (n=27)	28,4 ± 0,9 (n=27)
<i>CAP^{42b}/Df(2R)BSC281</i>	53 % (n=17)	106,3 ± 1,9 (n=10)	28,4 ± 1,2 (n=10)
<i>CAP^{49e}</i>	63 % (n=75)	106,2 ± 2,6 (n=29)	28,6 ± 0,9 (n=29)
<i>CAP^{49e}/Df(2R)BSC281</i>	55 % (n=20)	105,8 ± 2,9 (n=8)	28,9 ± 1,5 (n=8)
<i>Df(2R)BSC281/Df(2R)BSC281^[1]</i>	44 % (n=16)	104,9 ± 1,5 (n=9)	27,9 ± 0,3 (n=9)
<i>Mef>CAP-RNAi #36663</i>	44 % (n=39)	n.d.	n.d.
<i>CAP^{49e};UAS-CAP-C/tinCA4Gal4</i>	13% (n=8)	104,3 ± 0,7 (n=8)	28,3 ± 0,7 (n=8)

Die unter Herzdefekte vermerkten Daten beziehen sich auf die durch Einzelfärbungen mit anti-Mef detektierten Anordnungsdefekte der Kardioblasten.

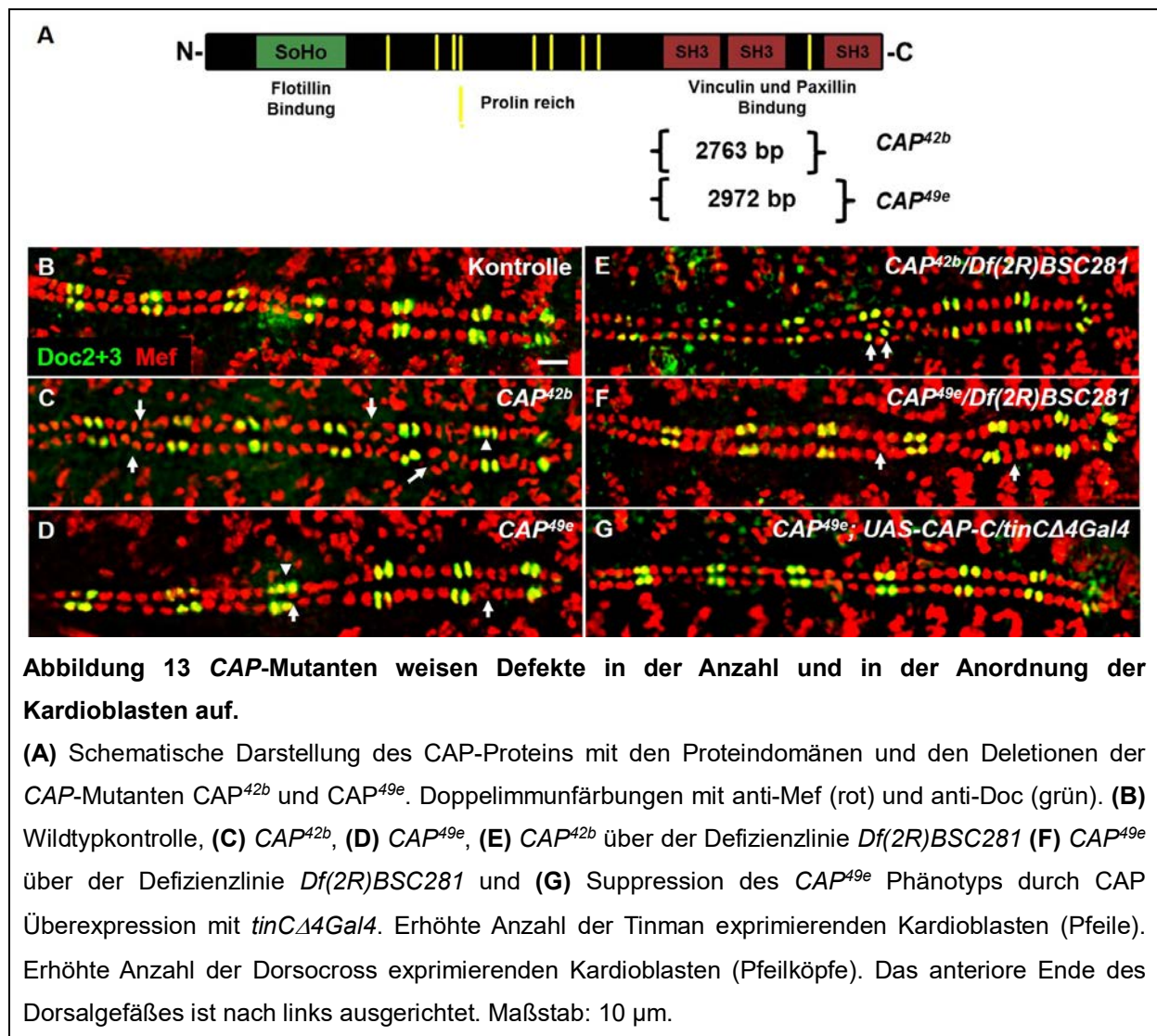
[1] Daten wurden freundlicher Weise von Dr. I. Reim (Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg) zur Verfügung gestellt. n.d. Daten wurden nicht erhoben.

Um die Frage zu klären, ob es sich dabei nur um Anordnungsdefekte oder sogar eine Erhöhung der Zahl der Kardioblasten handelt, habe ich Doppelimmunfärbungen durchgeführt. Im Wildtyp besteht jedes Hemisegment des Dorsalgefäßes aus 6 Kardioblasten, von denen zwei Kardioblasten Seven up und vier Tinman exprimieren. Für meinen Versuch nutzte ich neben dem anti-Mef auch den anti-Doc Antikörper, der nur die Seven up exprimierenden Kardioblasten anfärbt. Vergleicht man die CAP-Mutanten mit der Kontrolllinie, so ist neben Anordnungsdefekten auch eine leichte Erhöhung der Zellzahl der Kardioblasten zu erkennen (Abbildung 13B,C,D). Der Anstieg der Zellzahl ist dabei nicht uniform, sondern auf vereinzelte Hemisegmente beschränkt. Dabei war vor allem eine Erhöhung der Tinman exprimierenden Kardioblasten um bis zu sechs oder acht Zellen im betroffenen Hemisegment nachweisbar (Tabelle 16). Es konnten auch vereinzelt mehr Doc/Svp positive Kardioblasten verzeichnet werden (Tabelle 16). Die Zunahme der Kardioblastenzellzahl führt zu einem Phänotyp, in dem drei oder mehr Kardioblasten statt der zwei kontralateralen Kardioblasten einander an der dorsalen Mittellinie treffen.

Um die Möglichkeit sekundärer Mutationen als Erklärung für diesen Effekt auszuschließen, verwendete ich eine Defizienzlinie *Df(2R)BSC281* auf dem

2R Chromosom, bei der unter anderem der gesamte CAP-Genlocus deletiert ist. Diese Defizienzlinie heterozygot über *CAP^{42b}* oder *CAP^{49e}* reproduziert die Fehlanordnung und die anormale Anzahl der Kardioblasten, jedoch in leicht geringerer Penetranz als die homozygoten CAP-Mutanten (Tabelle 16; Abbildung 13E,F). Die Untersuchung der homozygoten Defizienzlinie *Df(2R)BSC281* durch Dr. I. Reim (Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg) zeigte auch den beschriebenen Herzphänotyp mit jedoch noch geringerer Penetranz als die heterozygoten CAP-Mutanten über der Defizienzlinie (Tabelle 16; siehe Diskussion 4.2.2.1.1).

Darüber hinaus konnte ich den Phänotyp der CAP-Mutanten durch Überexpression eines *UAS-CAP-C*-Konstruktes mit der Kardioblasten-spezifischen Treiberlinie *tinC4Gal4* (Tabelle 16; Abbildung 13G) supprimieren.



Somit wird deutlich, dass CAP für die Herzmorphogenese eine wichtige Rolle spielt. Um die Funktionsweise von CAP zu untersuchen, waren weiterführende Analysen auf genetischer, molekularer und ultrastruktureller Ebene erforderlich.

3.2.4 CAP ist essentiell für die Herzlumenbildung

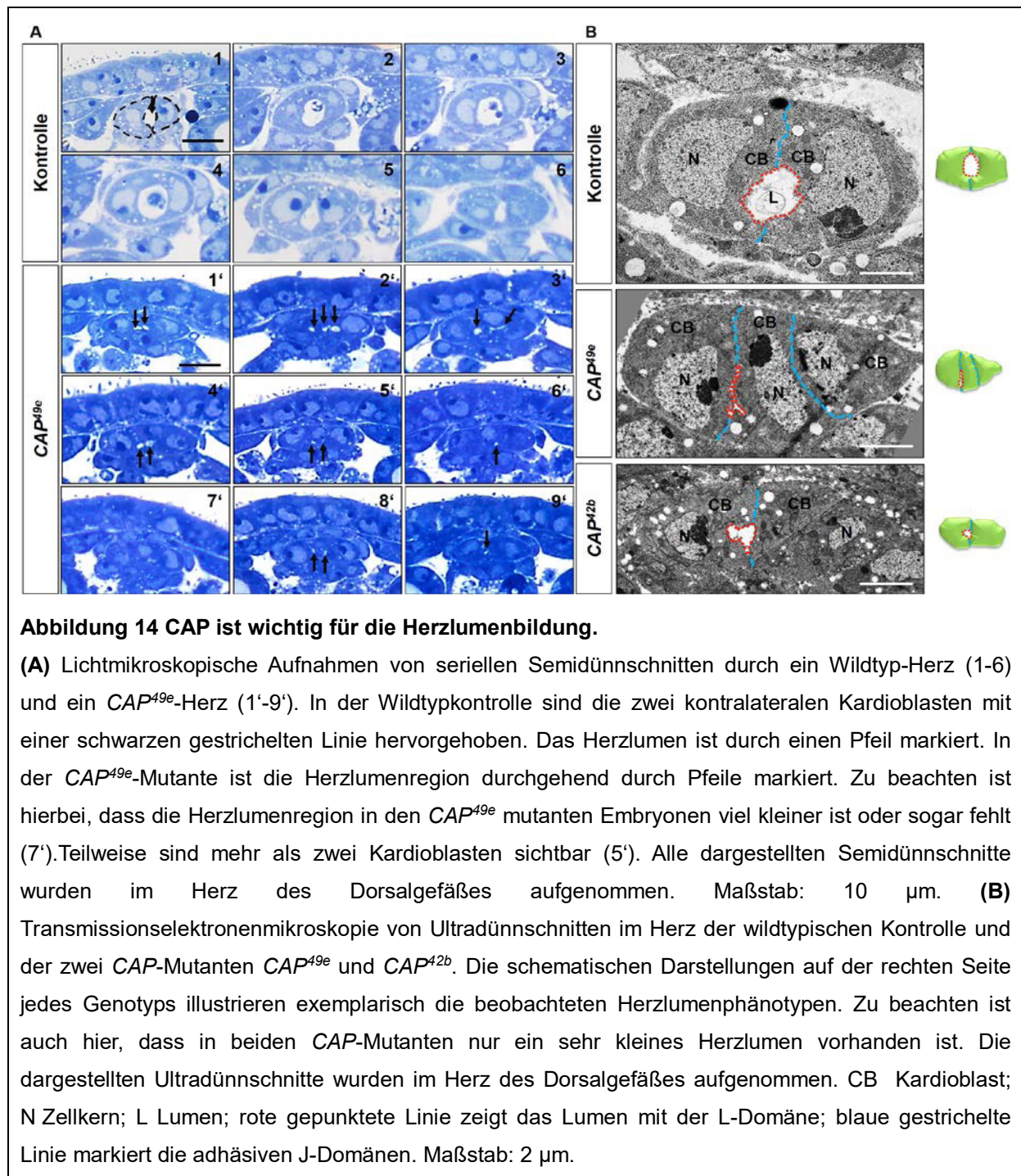
Durch ultrastrukturelle Analysen können Defekte an den Zell-Zellkontakten und im Lumen untersucht werden. In Semidünnschnitten und elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Feinschnitten des embryonalen Dorsalgefäßes analysierte ich die Zellform der Kardioblasten und das Herzlumen.

In Wildtyp-Embryonen treffen sich die beiden kontralateralen Kardioblasten an der dorsalen Mittellinie und bilden zwischen sich wie in Abbildung 14A und B (Kontrolle) dargestellt ein Lumen aus. In den beiden CAP-Mutanten konnte ich im Vergleich zu der Wildtyp-Kontrolle einen Defekt in der Ausbildung des Herzlumens beobachten (Abbildung 14A (*CAP^{49e}*) und B (*CAP^{49e}* und *CAP^{42b}*)). In den seriellen Semidünnschnitten in Abbildung 14A (*CAP^{49e}*) und den Ultradünnschnitten in Abbildung 14B (*CAP^{49e}* und *CAP^{42b}*) ist zu sehen, dass zwar luminale Bereiche ausgebildet werden, diese jedoch im Vergleich zur Kontrolle weitaus kleiner sind. Dieser Herzlumenphänotyp konnte in zwei von drei *CAP^{49e}*-Embryonen und sechs von zehn *CAP^{42b}*-Embryonen nachgewiesen werden, während alle fünf Kontrollembryonen ein normales Herzlumen aufwiesen.

Es stellte sich die Frage, ob der beobachtete Herzlumenphänotyp auf die Bereiche der fehlangeordneten Kardioblasten begrenzt ist. Um dieser Frage nachzugehen, habe ich serielle Semidünnschnitte durchgeführt und konnte nachweisen, dass die gestörte Lumenbildung nicht nur konsistent den gesamten Herzschnäbel betrifft, sondern auch unabhängig von den beobachteten fehlangeordneten Kardioblasten auftritt (Abbildung 14A; *CAP^{49e}*). Dabei konnte ich Herzlumendefekte sowohl in Bereichen mit drei kontralateralen Kardioblasten (Abbildung 14A-2'; drei verkleinerte luminale Bereiche durch Pfeile gekennzeichnet) als auch in Bereichen, in denen zwei kontralaterale Kardioblasten aufeinandertreffen, detektieren (Abbildung 14A-9'; Pfeil markiert verkleinertes Herzlumen).

Die Abbildung 14B zeigt Ultradünnschnitte der Kontrolle sowie der beiden CAP-Mutanten. Dabei sind in der *CAP^{49e}*-Mutante drei Kardioblasten und in der *CAP^{42b}*-Mutante zwei Kardioblasten sichtbar. Diese Darstellung ist jedoch exemplarisch und kein weiteres phänotypisches Merkmal. Vielmehr zeigen die

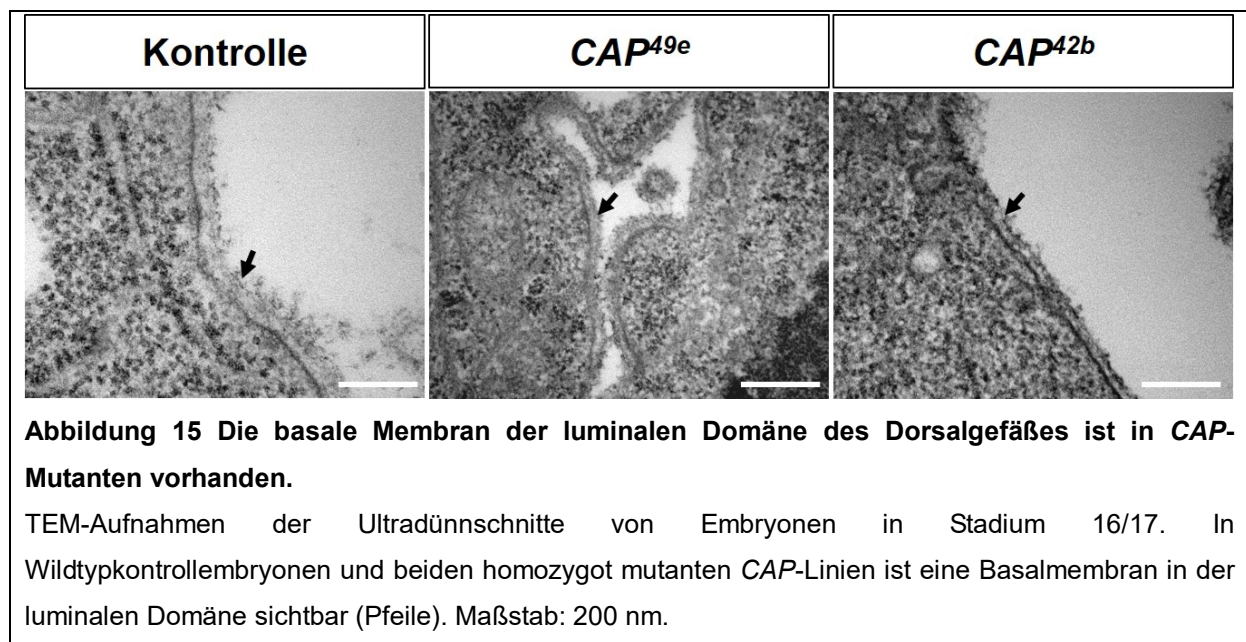
Ultradünnschnitte der beiden Mutanten nochmals, dass die beobachteten Lumendefekte nicht nur in Bereichen fehlangeordneter Kardioblasten auftreten, sondern auch zwischen zwei Kardioblasten nachweisbar sind.



Doch wodurch wird der verkleinerte Lumenphänotyp hervorgerufen? Medioni et al. (2008) postulierten, dass für die Lumenbildung die Begrenzung der adhäsiven J-Domänen in Verbindung mit Zellformänderungen der Kardioblasten die treibenden Kräfte sind. So bilden *slit/robo*-Mutanten beispielsweise Zellkontakte entlang der

gesamten Kontaktseite aus (Albrecht et al., 2011; Medioni et al., 2008; Santiago-Martínez et al., 2008). Betrachtet man die dorsalen und ventralen adhäsiven J-Domänen der beiden *CAP*-Mutanten im Vergleich mit dem Wildtyp, so scheinen die Kontaktbereiche in den Mutanten normal ausgeprägt zu sein (Abbildung 14B; blaue gestrichelte Linie).

Wie bereits erwähnt, spielen bei der Lumenbildung auch die Zellformveränderungen eine wichtige Rolle. Wie in der Abbildung 14B (Kontrolle) ersichtlich ist, weisen die Kardioblasten im Wildtyp eine Sichelform auf. Nachdem die Kardioblasten zwischen sich das Lumen ausgebildet haben, kommt es zu einem Wachstum der Kardioblasten und einer damit verbundenen Vergrößerung des Lumens. Vergleicht man die Zellform der Kardioblasten der *CAP*-Mutanten mit dem Wildtyp, so stellt man fest, dass die Kardioblasten der *CAP*-Mutanten anstelle der typischen Sichelform eher eine Halbmondform aufweisen. Neben dem Größenwachstum des Lumens scheint vor allem die Krümmung der luminalen Membran gestört zu sein (Abbildung 14B, rote gepunktete Linie). Dennoch konnte ich eine basale Membran in der luminalen Domäne der Kardioblasten auch in beiden Mutanten nachweisen (Abbildung 15). Der beobachtete Lumenphänotyp führt zu der Frage, ob die Polarisierung der Kardioblasten an der luminalen Membrandomäne normal ausgeprägt ist.



3.2.5 Die Polarität der Kardioblastenmembran an der luminalen Domäne ist in CAP-Mutanten unverändert

Ein sehr ähnlicher Herzlumendefekt, wie ich ihn bei den beiden *CAP*-Mutanten beobachten konnte, ist bereits bei einem Funktionsverlust von Proteinen des Integrin-Signalwegs, als auch des Robo/Slit-Signalwegs bekannt (MacMullin und Jacobs, 2006; Vanderploeg et al., 2012). In diesen Mutanten wurde gezeigt, dass die Polarität der Kardioblastenmembran verändert ist. Um zu klären, ob dies auch in *CAP*-Mutanten der Fall ist, untersuchte ich die Verteilung luminaler Proteine in Wildtyp und *CAP^{49e}*-Mutanten.

In Wildtyp-Embryonen ist das zytoplasmatische CAP-Protein in der Peripherie an der abluminalen, lateralen und luminalen Kardioblastenmembran lokalisiert (Abbildung 16A,A',G,G'). Der luminale Marker Slit ist als Ligand der Roborezeptoren im Wildtyp vor allem extrazellulär in der luminalen Domäne lokalisiert (Abbildung 16B,B') und ko-lokalisiert dort zytologisch mit CAP (Abbildung 16C,C'). In *CAP^{49e}*-Mutanten ist kein CAP-Protein mehr nachweisbar (Abbildung 16D,D',J,J'). Das bestätigt nochmals die Spezifität des produzierten CAP-Antikörpers. Obwohl Slit auch in der *CAP*-Mutante weiterhin richtig lokalisiert ist, scheint seine Verteilung diffuser zu sein, als in der Wildtyp-Kontrolle und ein Lumen ist nicht mehr klar erkennbar (Abbildung 16E,E',F,F').

Des Weiteren analysierte ich die Verteilung des Transmembranrezeptors β PS1 Integrin. Im Wildtyp ist β PS1 Integrin sehr abundant in der luminalen, aber auch in der abluminalen Kardioblastenmembran lokalisiert (Abbildung 16H,H'), wo β PS1 Integrin auch zytologisch mit CAP ko-lokalisiert (Abbildung 16I,I'). In den *CAP^{49e}*-Mutanten ist β PS1 Integrin zwar auch in der luminalen und abluminalen Membran der Kardioblasten lokalisiert, aber ähnlich wie bei Slit erscheint die Verteilung diffuser, und ein Lumen ist nicht mehr klar erkennbar (Abbildung 16K,K',L,L').

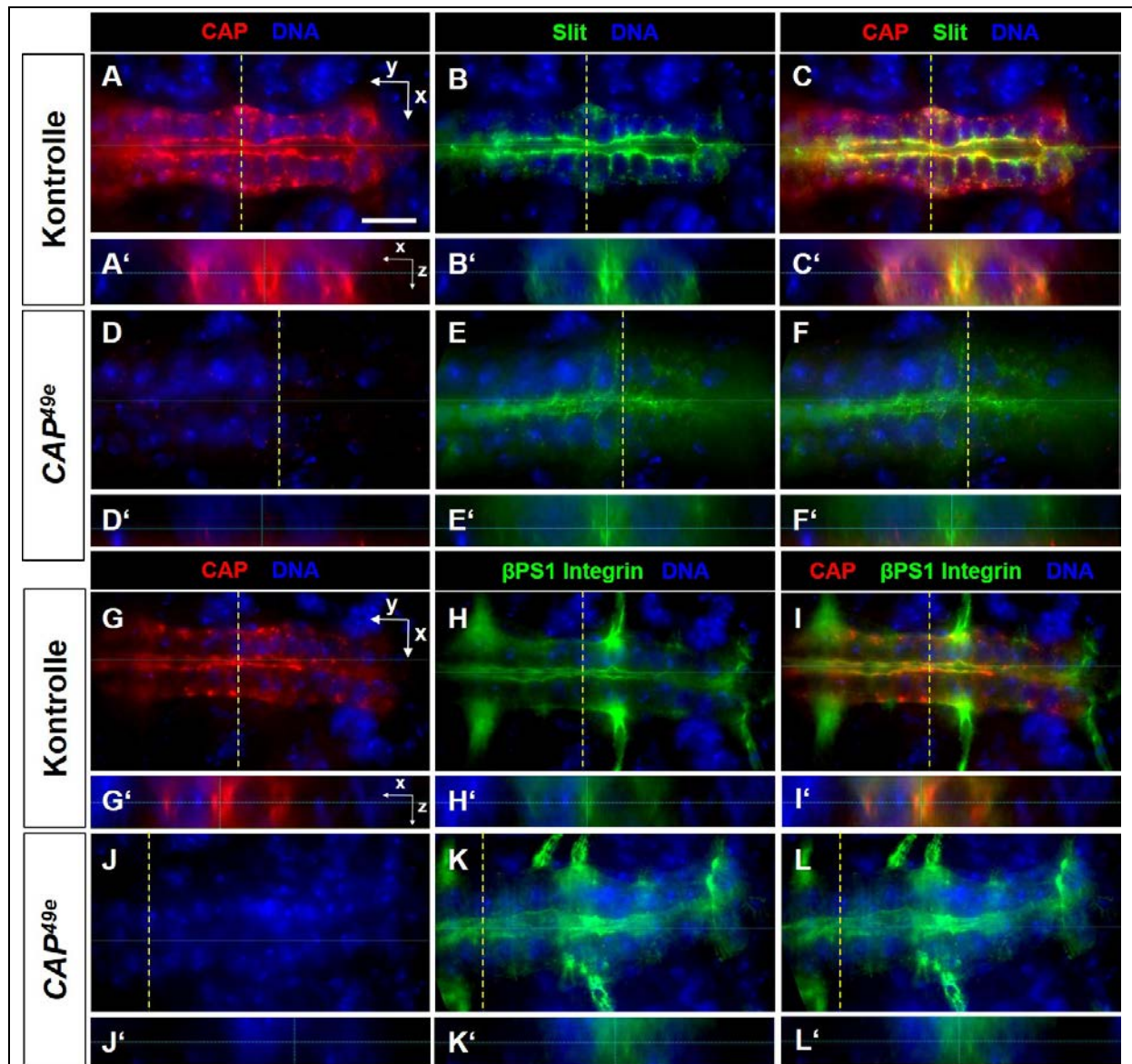
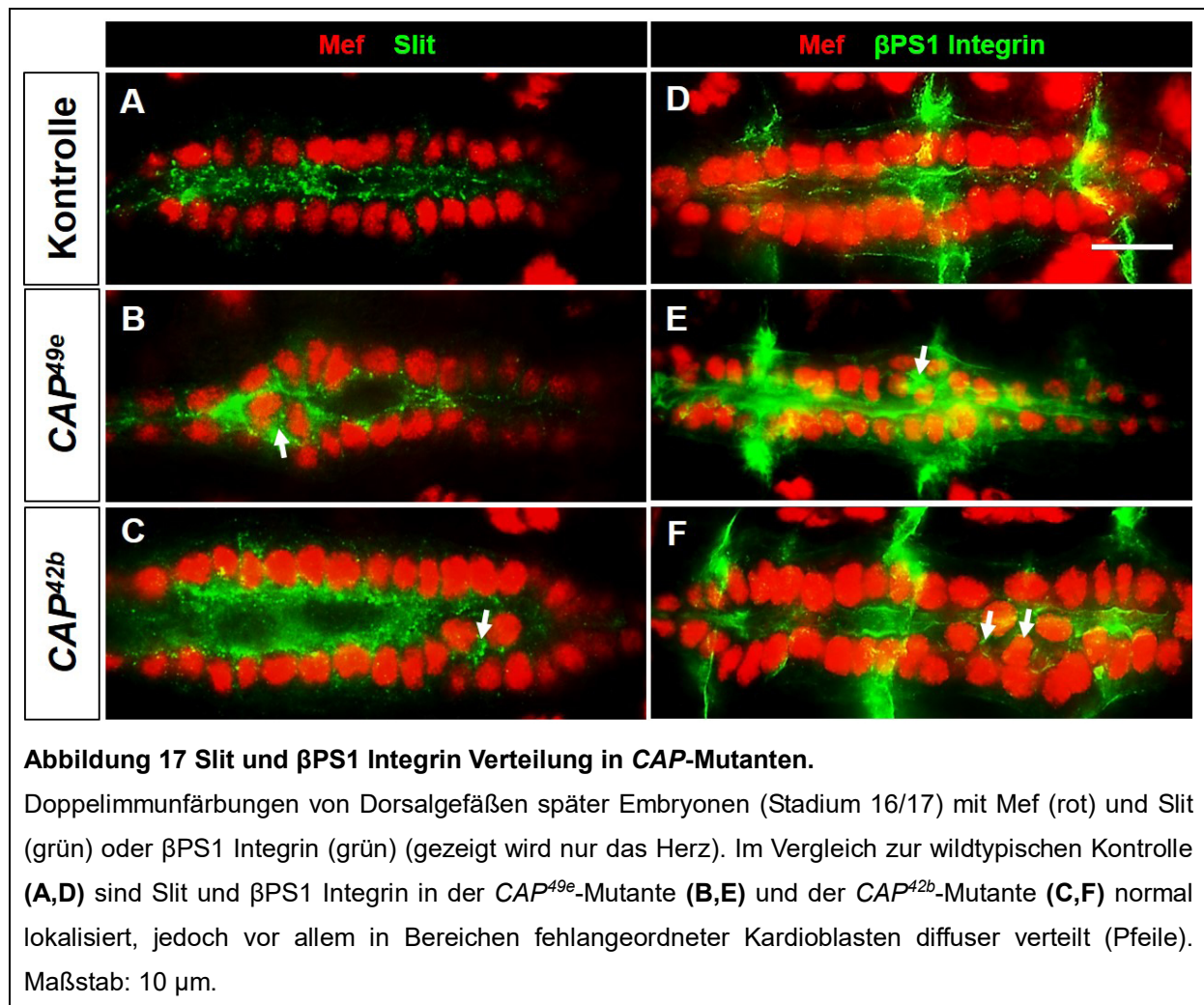


Abbildung 16 Die Verteilung der luminalen Marker Slit und β PS1 Integrin ist diffuser in *CAP*-Mutanten als im Wildtyp.

Doppelimmunfärbungen von Embryonen des Stadiums 16/17 mit CAP (rot) und Slit (grün) in **A-F** sowie CAP (rot) und β PS1 Integrin (grün) in **G-L**. Die DNA der Zellkerne ist mit Hoechst (blau) angefärbt. In (**A,B,C,G,H,I**) ist das Herz von Wildtyp-Embryonen gezeigt. Das Herz von *CAP^{49e}*-Embryonen ist in (**D,E,F,J,K,L**) dargestellt. Die Schnittebenen der zugehörigen Z-Ebenen (**A'-I'**) sind durch eine gestrichelte Linie markiert. Für Details bezüglich der Z-Ebenen siehe Materialien und Methoden 2.2.5. Maßstab: 10 μ m.

Weitere Doppelimmunfärbungen der Wildtypkontrolle und der beiden *CAP*-Mutanten mit anti-Mef und anti-Slit sowie anti-Mef und anti- β PS1 Integrin bestätigten die diffuse Verteilung der Proteine (Abbildung 17). In der Wildtypkontrolle sieht man die Lokalisation von Slit an der luminalen Kardioblastenmembran und auch β PS1 Integrin ist luminal und schwächer auch abluminal lokalisiert. Betrachtet man

die *CAP*-Mutanten, so scheint die Polarität der Kardioblastenmembran generell normal zu sein, da sowohl Slit als auch β PS1 Integrin normal lokalisiert sind. Dennoch gibt es Polaritätsprobleme der Kardioblastenmembran, die in dem diffusen Erscheinungsbild der luminalen Marker sichtbar werden. Dabei ist in den beiden *CAP*-Mutanten sichtbar, dass vor allem in Bereichen von fehlangeordneter Kardioblasten die Slit als auch β PS1 Integrin Verteilung diffuser erscheint. (Abbildung 17, weiße Pfeile).



Zusammenfassend stelle ich fest, dass die Polarisation der Kardioblastenmembran immer noch vorhanden ist, dabei aber die Verteilung der luminalen Polaritätsmarker Slit und β PS1 Integrin in *CAP*-Mutanten weniger diskret ist. Dies steht auch im Einklang mit den Beobachtungen der TEM-Mikroskopie Experimente, in denen ich zeigen konnte, dass das Fehlen eines normalen Lumens konsistent entlang der gesamten Länge des Dorsalgefäßes und unabhängig von fehlangeordneten Kardioblasten ist (Abbildung 14A). Allerdings konnte ich auch zeigen, dass in dem

kleinen Lumen der *CAP*-Mutanten eine luminale Basalmembran vorhanden ist (Abbildung 15).

3.2.6 *CAP* interagiert mit Komponenten des Integrin-Signalwegs während der Herzentwicklung

CAP ist ein fokales Adhäsionsprotein, das mit den C-terminalen SH3-Domänen an Vinculin und Paxillin binden kann, während die N-terminale Region an das Aktinzytoskelett bindet. Es gibt Hinweise, dass *CAP* dadurch als Verbindung zwischen dem Aktinzytoskelett und den fokalen Adhäsionen dient und wichtig für die Stabilität der fokalen Adhäsionskontakte ist (Zhang et al., 2006). Eine neue Studie über die Rolle von *CAP* an den Muskelansatzstellen konnte zeigen, dass *CAP* mit dem Integrin-Signalweg interagiert (Bharadwaj et al., 2013). Die zytologische Ko-Lokalisation von *CAP* und β PS1 Integrin im embryonalen Dorsalgefäß legt die Frage nahe, ob *CAP* mit Integrin-Signalkomponenten auch während der Herzentwicklung interagiert. In diesem Zusammenhang konnte ich zeigen, dass bereits im Embryonalstadium 14 eine zytologische Ko-Lokalisation der beiden Proteine *CAP* und β PS1 Integrin in den migrierenden Herzvorläuferzellen nachweisbar ist (Abbildung 18).

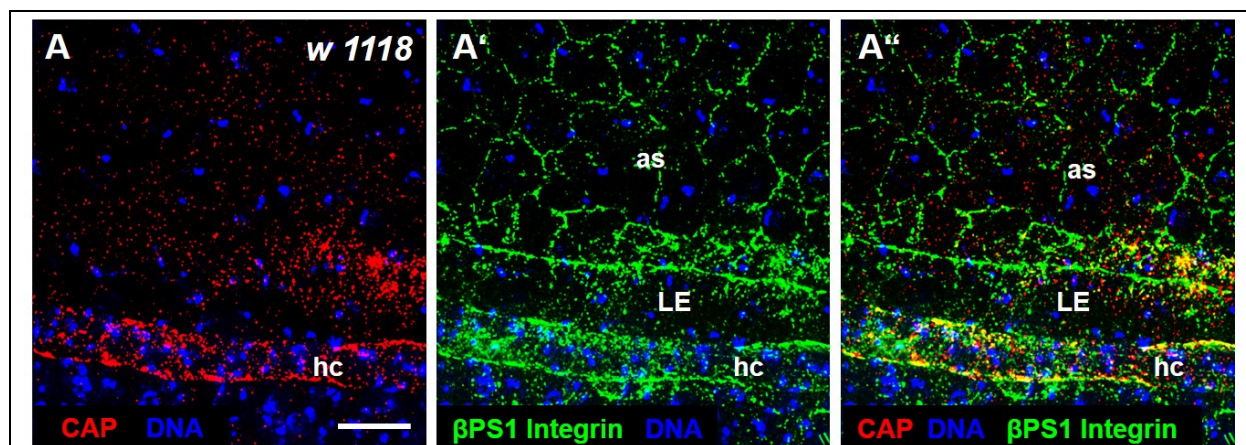
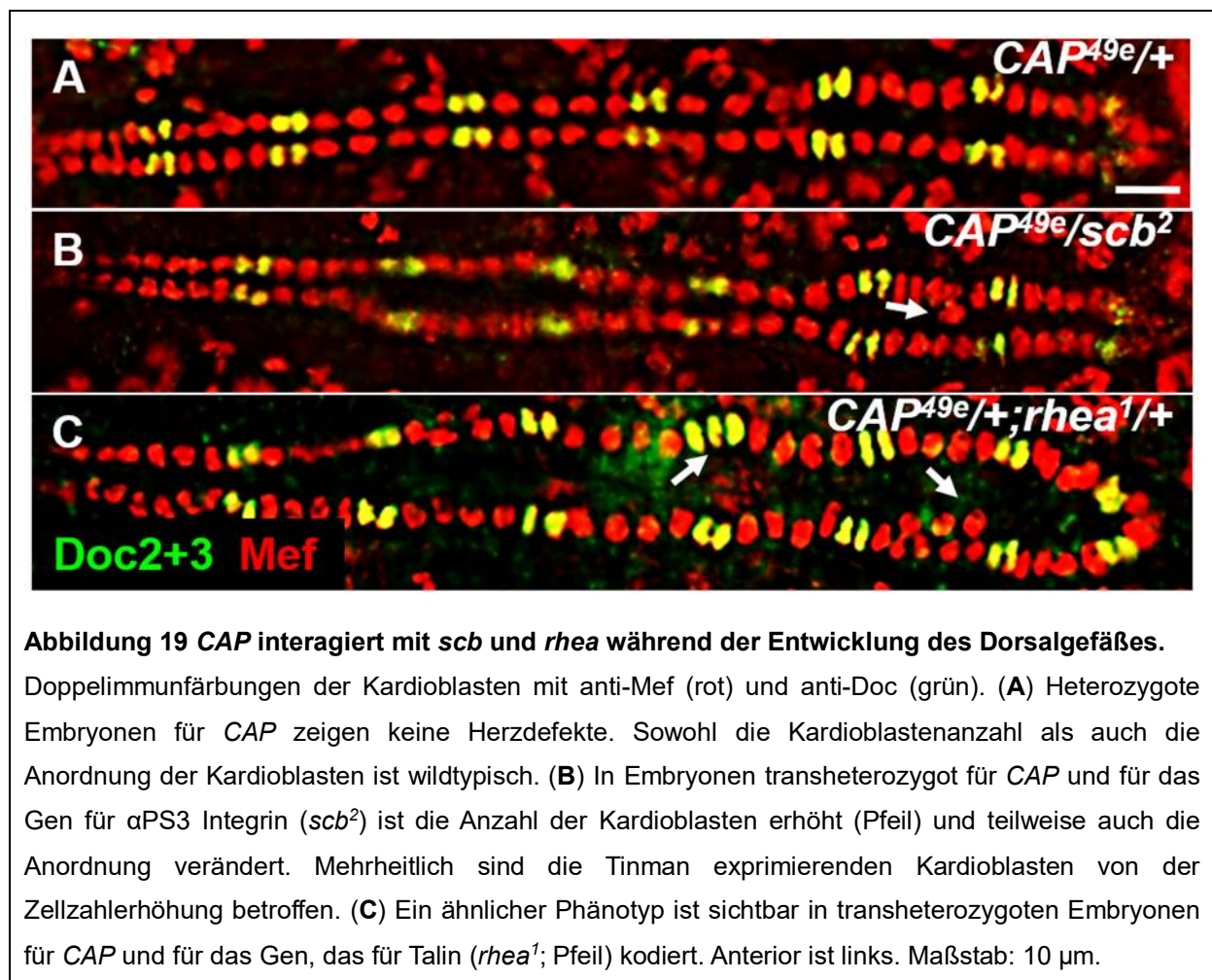


Abbildung 18 Ko-Expression von *CAP* und β PS1 Integrin im Embryonalstadium 14.

Doppelimmunfärbungen mit *CAP* (rot) (**A**) und β PS1 Integrin (grün) (**A'**) in den migrierenden Herzvorläuferzellen (hc). β PS1 Integrin ist zudem auch in der Amnioserosa (as) und der *Leading edge* (LE) exprimiert (**A'**). Die DNA der Zellkerne ist mit Hoechst angefärbt. (**A''**) Die zytologische Ko-Lokalisation von *CAP* und β PS1 Integrin in den migrierenden Herzvorläuferzellen (hc) ist gezeigt. Maßstab: 10 μ m.

Diese zytologische Ko-Lokalisation ist bis zum Ende der Embryogenese und darüber hinaus auch im larvalen und adulten Dorsalgefäß zu beobachten (siehe Abbildung 24A und Abbildung 25C). In der Arbeit von Bharadwaj et al. (2013) wurde bereits die genetische Interaktion von CAP mit Vinculin an den Muskelansatzstellen gezeigt. In der gleichen Arbeit wurde auch eine massenspektroskopische Analyse durchgeführt, bei der unter anderem Talin als ein möglicher weiterer Interaktionspartner identifiziert wurde. Um zu testen, ob CAP auch mit Genen des Integrin-Signalwegs während der Bildung des Dorsalgefäßes interagiert, untersuchte ich die genetische Interaktion von CAP mit dem α PS3 Integrinrezeptor (kodiert durch das Gen *scb*), und Talin (kodiert durch das Gen *rhea*), einem zytoplasmatischen Effektor des Integrin-Signalweges. Frühere Studien zeigten, dass heterozygote Mutanten des α PS3 Integrinrezeptors (*scb*²) eine normale Herzentwicklung aufweisen (Vanderploeg et al., 2012). Heterozygote CAP^{49e}-Mutanten zeigen auch keine zusätzlichen oder fehlangeordneten Kardioblasten (Abbildung 19A).



Allerdings konnte ich in transheterozygoten Mutanten von *CAP^{49e}* und *scb²* sowie *CAP^{49e}* und *rhea¹* einen ähnlichen, wenn auch schwächer ausgeprägten Phänotyp wie in homozygoten *CAP*-Mutanten beobachten (Abbildung 19B,C). Dies zeigt, dass *CAP* mit *scb* und *rhea* während der Herzentwicklung interagiert.

3.2.7 *CAP* mutante Fliegen weisen Defekte in der Herzfunktion auf

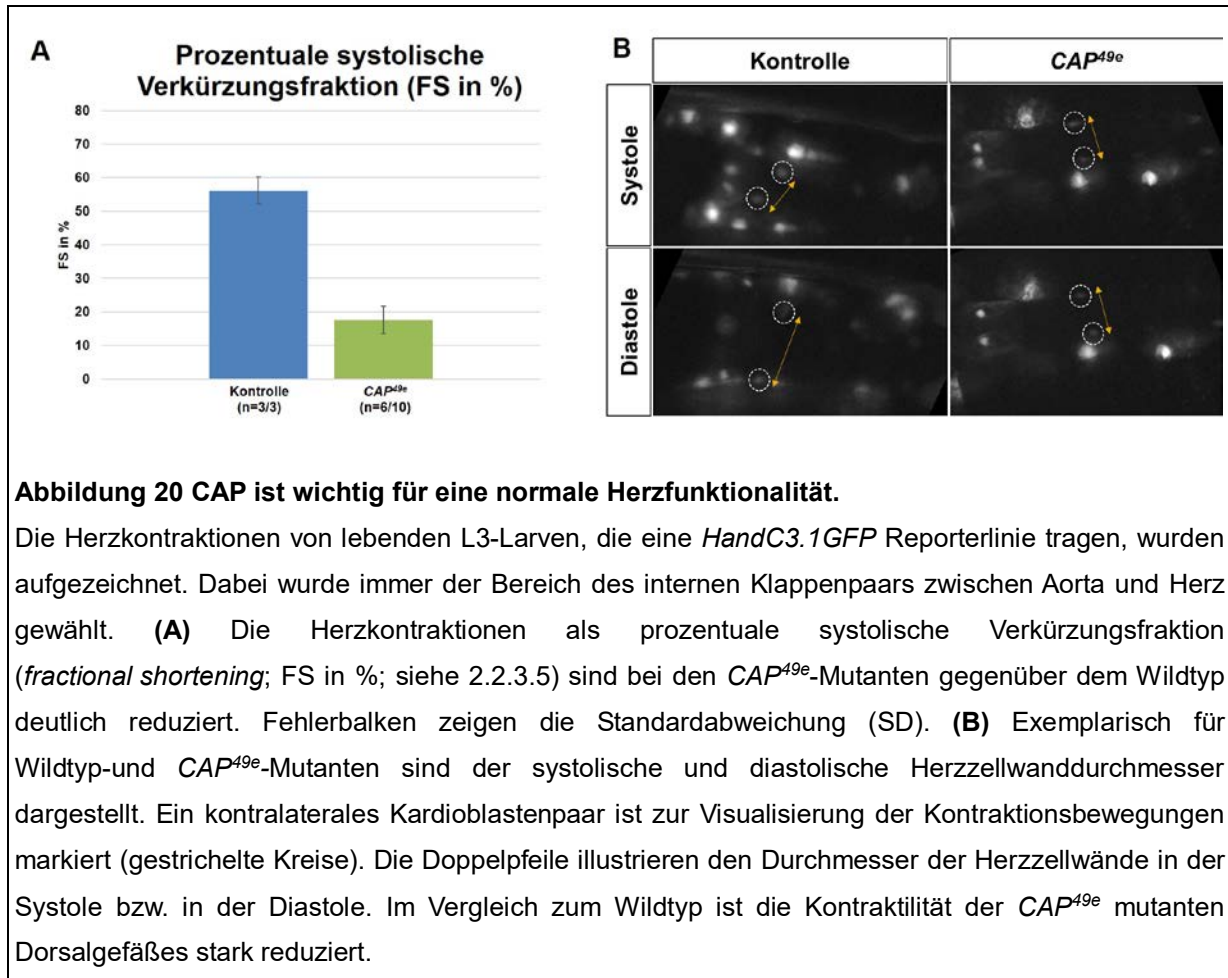
Meine bisherigen Untersuchungen der *CAP* Funktion waren vor allem darauf ausgerichtet zu verstehen, welche Rolle *CAP* bei der embryonalen Herzentwicklung spielt. Am Ende der Embryogenese beginnt das Dorsalgefäß die Hämolymphe zu pumpen und es kommt während der Larven- und Puppenstadien zu Umbildungen des Dorsalgefäßes. Es stellte sich also die Frage, inwieweit sich ein Funktionsverlust von *CAP* auf die weitere Entwicklung und Funktion des Dorsalgefäßes auswirkt. Dafür untersuchte ich die Herzfunktion auf zwei verschiedene Arten. Zuerst überprüfte ich, ob die Kontraktilität des Dorsalgefäßes beeinträchtigt ist. Dafür analysierte ich an lebenden wildtypischen und *CAP^{49e}* mutanten L3-Larven die Kontraktilität des larvalen Dorsalgefäßes.

Für die Darstellung des Dorsalgefäßes *in vivo* nutzte ich die *HandC3.1GFP* Reporterlinie (Sellin et al., 2006). In L3-Larven ist die Aorta vom Herz durch ein internes Klappenpaar getrennt. In den Live-Videoaufnahmen fokussierte ich auf den Bereich um das interne Klappenpaar und analysierte die systolischen und diastolischen Bewegungen der Herzzellwände. Darüber hinaus untersuchte ich auch die Bewegungen der internen Herzklappe.

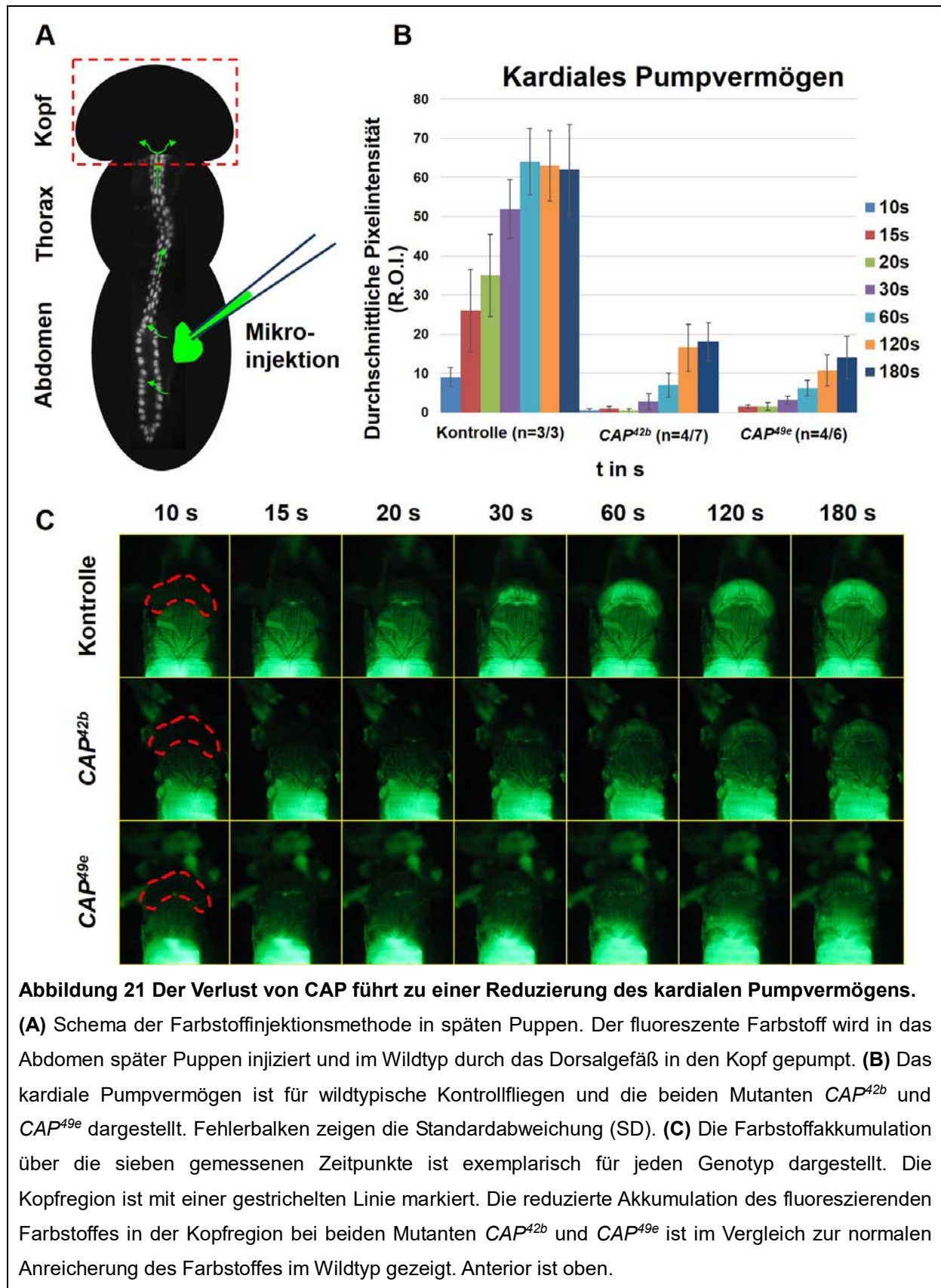
In Wildtyp-Larven folgt der Herzschlag einem regelmäßigen Rhythmus und die systolischen und diastolischen Bewegungen der Herzzellwände sind deutlich zu sehen. Während der Diastole bleibt das interne Klappenpaar geschlossen und die Hämolymphe sammelt sich im Herz. In der darauffolgenden systolischen Phase kontrahieren die Herzzellwände, das interne Klappenpaar öffnet sich und die Hämolymphe wird in die Aorta gepumpt (Abbildung 20B; Film S1 siehe Anhang).

Bei den Analysen der *CAP* mutanten L3-Larven konnte ich bei etwa 60 % der Larven eine Veränderung der Bewegungen der Herzzellwände zeigen. Sowohl die systolischen als auch die diastolischen Bewegungen waren im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle deutlich reduziert, woraus sich eine reduzierte systolische Verkürzungsfraction (*fractional shortening*) ergab (Abbildung 20A, B; Film S2 siehe Anhang). Die Funktionsweise des internen Klappenpaars war dabei normal.

Eine mögliche Erklärung wäre, die reduzierte Kontraktilität beruht darauf, dass in 60 % der *CAP*-Mutanten die Ausbildung eines funktionalen Herzsyznzytiums mit regelmäßiger Systole und Diastole gestört ist.



Als zweiten Ansatz, und um zu überprüfen, ob ähnliche Defekte nach der puppalen Remodellierung des Dorsalgefäßes auch im adulten Dorsalgefäß auftreten, untersuchte ich späte Puppen, bei denen die Umstrukturierungen schon erfolgt sind. Das kardiale Pumpvermögen analysierte ich mit einem semi-quantitativen System, bei dem ein Fluoreszenzfarbstoff in das Abdomen der Puppe injiziert wurde (Abbildung 21A; Drechsler et al., 2013). In Wildtyp-Puppen wird der Fluoreszenzfarbstoff durch das Dorsalgefäß in den Kopfbereich gepumpt und akkumuliert dort (Abbildung 21B,C). Die Farbstoffakkumulation im Kopfbereich wurde in Form der durchschnittlichen Pixelintensität über sieben Messzeitpunkte ermittelt und als kardiales Pumpvermögen bezeichnet.



In Übereinstimmung mit dem Kontraktionsphänotyp der L3-Larven, zeigten vier von sieben CAP^{42b} mutanten und vier von sechs CAP^{49e} mutanten Puppen ein stark

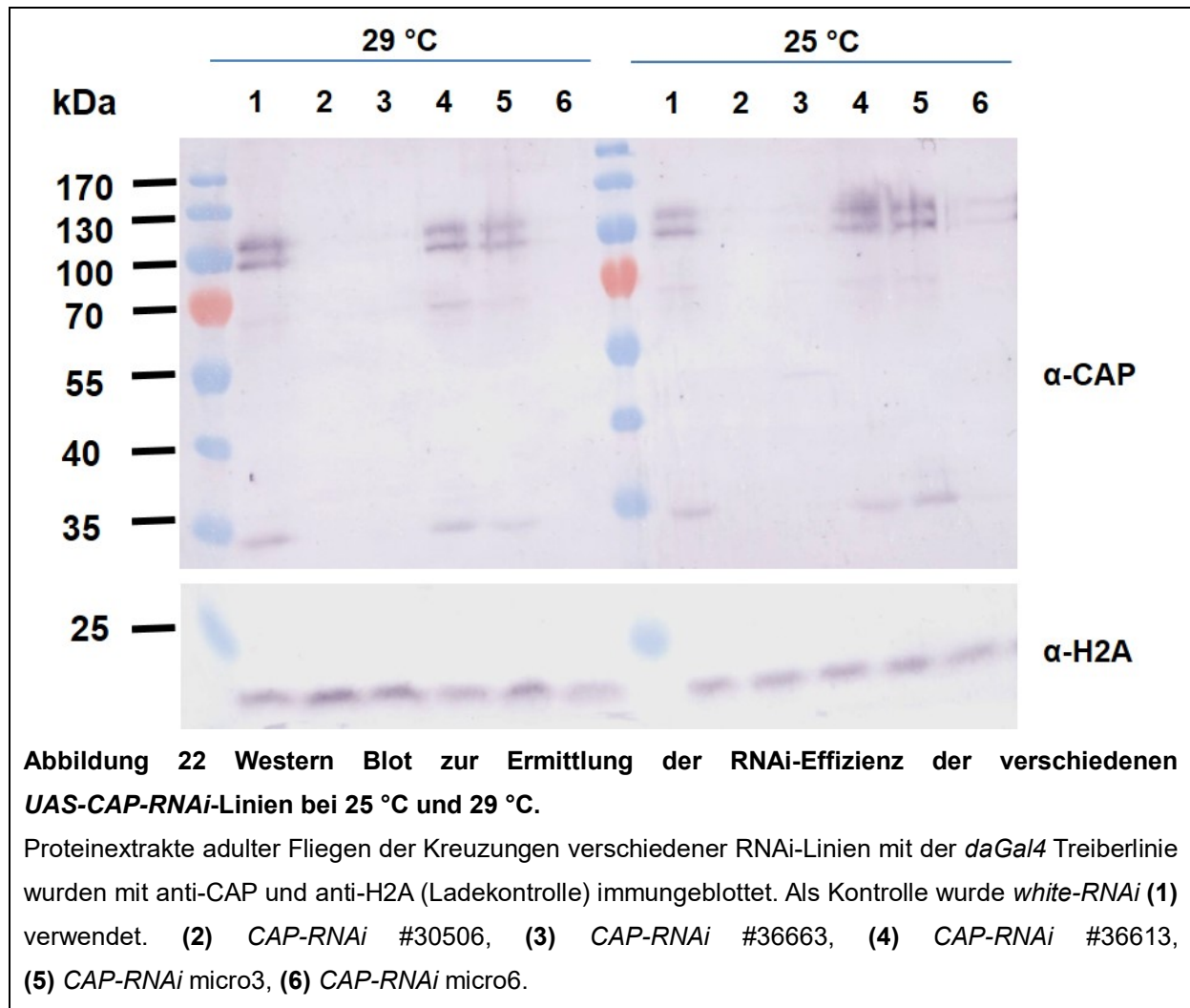
verringertes kardiales Pumpvermögen (Abbildung 21B,C). Diese Beobachtung deutet ebenfalls auf Kontraktionsprobleme in dem Dorsalgefäß später Puppen hin. Zusammengefasst untermauern diese Daten, meine Hypothese, dass CAP eine Rolle bei der Ausbildung eines funktionalen Herzszytiums spielt.

3.2.8 CAP mutante Fliegen haben eine verkürzte Lebensdauer

Es ist bekannt, dass eine Beeinträchtigung der Herzfunktion eine reduzierte Lebenserwartung zur Folge haben kann (Melkani et al., 2011; Neely et al., 2010). Im Vergleich mit der Wildtyp-Kontrolle zeigen CAP-Mutanten eine Zunahme der embryonalen Letalität um etwa 10 %. Dennoch sind beide getesteten CAP-Mutanten (*CAP^{42b}* und *CAP^{49e}*) homozygot lebensfähig als adulte Fliegen.

Bei einer Analyse der Lebensdauer (siehe Materialien und Methoden 2.2.3.3) konnte ich eine verkürzte Lebensdauer der CAP-Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Fliegen feststellen (Abbildung 23A).

Um auszuschließen, dass der CAP Verlust in anderen CAP exprimierenden Geweben und Organen einen Einfluss auf die Lebensdauer hat, wiederholte ich den Lebensdauertest mit einem spezifischen RNAi-Knockdown von CAP im Dorsalgefäß. Dafür testete ich zunächst alle verfügbaren RNAi-Linien mit der ubiquitären Treiberlinie *daGal4* bei 25 °C und 29 °C, um die Effizienz des RNAi-Knockdowns der verschiedenen Linien durch Western Blot Analyse zu ermitteln (Abbildung 22). Dabei zeigte die Linie *CAP-RNAi* #30506 sowohl bei 25 °C als auch bei 29 °C die beste Effizienz (Abbildung 22 Spur 2).



Anschließend führte ich einen weiteren Lebensdauertest mit der *UAS-CAP-RNAi* Linie 30506 und zwei verschiedenen Treiberlinien durch. Dabei nutzte ich die sehr frühe Treiberlinienkombination *twistGal4; how^{24B}Gal4*, die bereits ab Embryonalstadium 6 eine Herunterregulierung von *CAP* im gesamten Mesoderm und später auch im Dorsalgefäß ermöglicht und die Treiberlinienkombination *tinDGal4; tinCΔGal4*, die eine Herunterregulierung von *CAP* ab Embryonalstadium 10 im dorsalen und später kardialen Mesoderm erlaubt. Die spezifische Herunterregulierung von *CAP* im Dorsalgefäß führte jedoch bei beiden Linien nicht zu einer reduzierten Lebensdauer (Abbildung 23B). Demnach scheint die reduzierte Lebensdauer zumindest nicht allein auf den in *CAP*-Mutanten beobachteten Herzdefekt zurückzuführen zu sein.

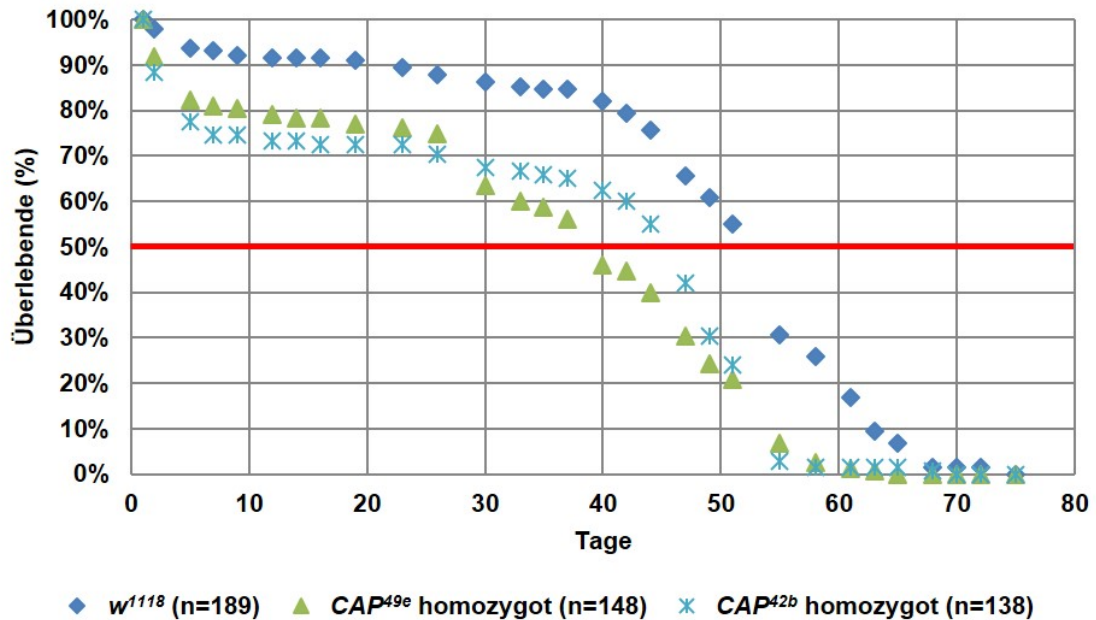
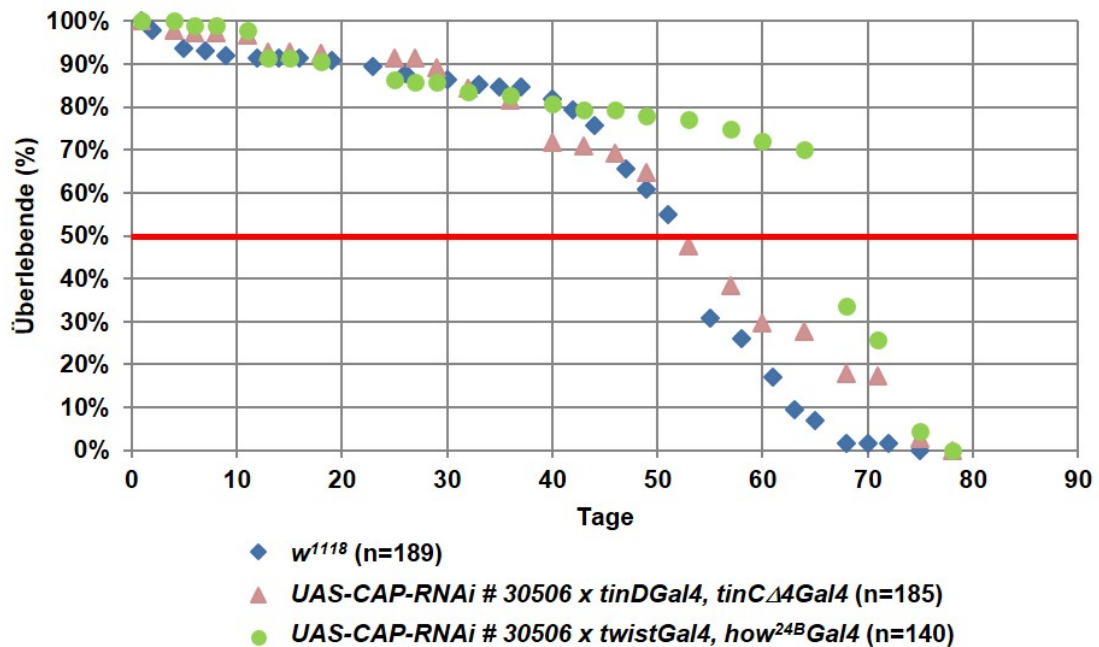
A**Lebensdauer****B****Lebensdauer**

Abbildung 23 Lebensdauer von CAP -Mutanten und einer $CAP-RNAi$ -Linie im Vergleich zum Wildtyp.

(A) Der Vergleich der Lebensdauerkurven von der Wildtyp-Kontrolle (w^{1118}) und den homozygoten CAP^{49e} und CAP^{42b} mutanten Fliegen zeigt eine verringerte Lebensdauer für beide CAP -Mutanten.

(B) Die Lebensdauerkurven der Kontrolle und der Herunterregulierung von CAP mit der Linie $UAS-CAP-RNAi \# 30506$ und zwei verschiedenen Treiberlinien weisen keine Unterschiede in der Lebensdauer auf. Die rote Linie markiert die Grenze bei der noch 50 % überlebende Fliegen von der Ausgangszahl vorhanden sind.

3.2.9 CAP ist im adulten Dorsalgefäß an den Zell-Zell-Kontaktstellen und den Z-Scheiben der Sarkomere lokalisiert

Die beobachteten Kontraktionsstörungen des larvalen und puppalen Dorsalgefäßes führten zu der Frage nach der Lokalisation des CAP-Proteins im larvalen und adulten Dorsalgefäß und ob Defekte in der Anatomie des Dorsalgefäßes feststellbar sind. Da über die Proteinexpression von CAP im larvalen und adulten Dorsalgefäß bisher nichts bekannt war, präparierte ich Dorsalgefäße von L3-Larven und adulten Fliegen.

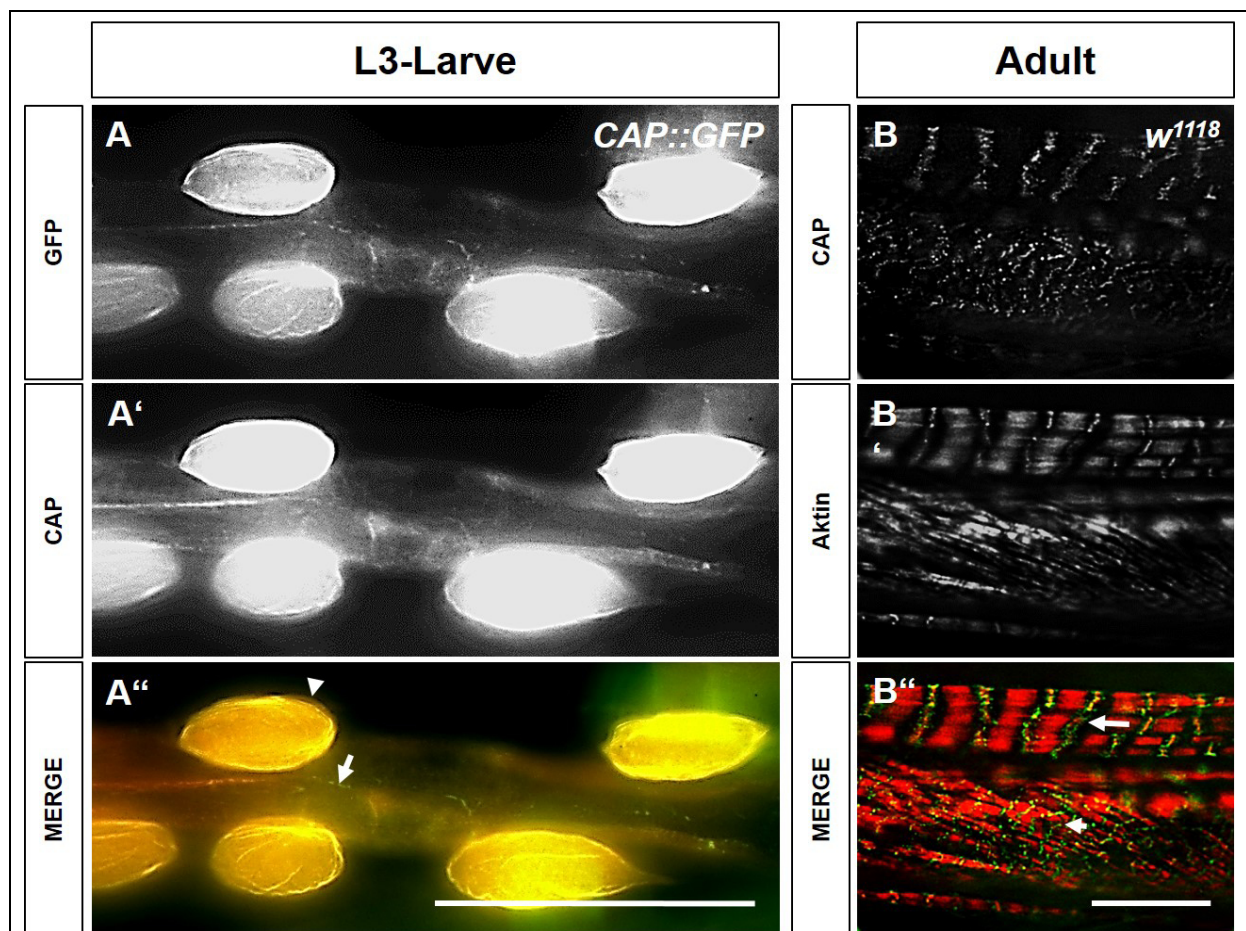


Abbildung 24 CAP ist im larvalen und adulten Dorsalgefäß exprimiert.

(A) Doppelimmunfärbungen des Dorsalgefäßes einer L3-Larve der *CAP::GFP* Linie mit anti-GFP (grün) und anti-CAP (rot). CAP ist exprimiert in den Perikardialzellen (Pfeilkopf) und an den Zell-Zell-Kontaktstellen (Pfeil). Maßstab: 100 µm **(B)** Doppelfärbungen eines adulten Dorsalgefäßes des *w¹¹¹⁸* Referenzstammes. Aktin (rot) und CAP (grün). CAP ist in den zirkulären Myofibrillen (Pfeilkopf) des Dorsalgefäßes und dem ventralen Longitudinalmuskel (Pfeil) lokalisiert. Maßstab: 10 µm.

In der L3-Larve ist CAP an den Zell-Zell-Kontaktstellen der Kardiomyozyten sowie in den Perikardialzellen detektierbar (Abbildung 24A, siehe auch Abbildung 12 und

Abbildung 25). Ich färbte adulte Dorsalgefäße mit CAP und Aktin und konnte so nachweisen, dass CAP mit sarkomeren Strukturen in einem gestreiften Muster in adulten Kardiomyozyten und dem ventralen longitudinalen Muskel lokalisiert ist (Abbildung 24b). Zur genauen Bestimmung der CAP Expression im adulten Dorsalgefäß nutzte ich die Z-Scheiben Proteine ZASP und Kettin sowie das an den Z-Scheiben und den Zell-Zell-Kontaktstellen lokalisierte β PS1 Integrin als Marker (Abbildung 25).

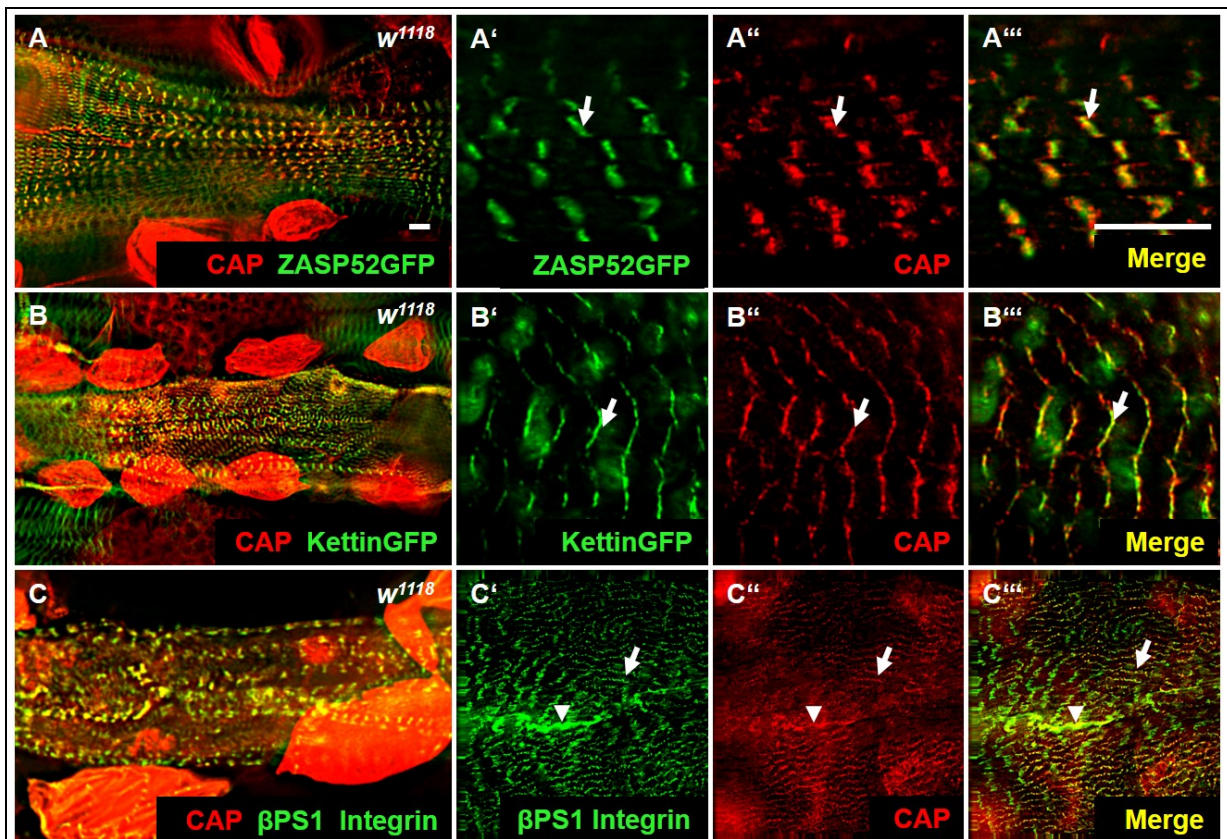


Abbildung 25 CAP lokalisiert im adulten Dorsalgefäß von *Drosophila* an den Zell-Zell-Kontaktstellen und den Z-Scheiben.

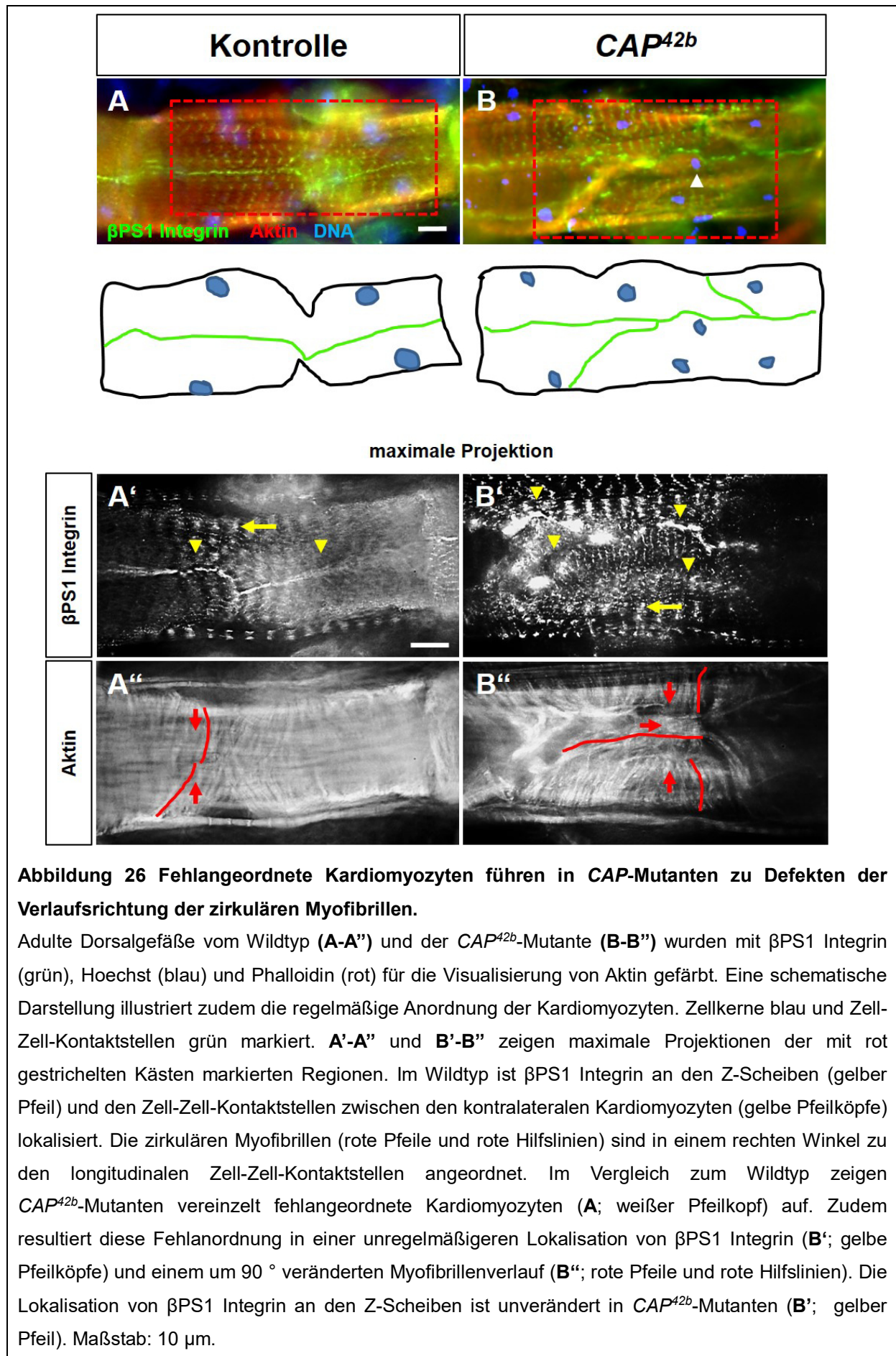
Doppelimmunfärbungen von CAP mit den Z-Scheiben Proteinen Zasp52 (**A**) und Kettin (**B**) sowie mit β PS1 Integrin (**C**) sind dargestellt. Sichtbar ist auch die Lokalisation von CAP in den Perikardialzellen. (**A'-A'''**) Vergrößerte Aufnahme des ventralen longitudinalen Muskels (VLM) gefärbt mit GFP für ZASP::GFP (**A'**) und CAP (**A''**). **A'''** zeigt die zytologische Ko-Lokalisation von ZASP (grün) und CAP (rot) an den Z-Scheiben (Pfeile) des VLMs. In **B'-B'''** ist die zytologische Ko-Lokalisation von Kettin (grün; Kettin::GFP) und CAP (rot) an den Z-Scheiben der zirkulären Myofibrillen der Kardiomyozyten dargestellt (Pfeile). In (**C'-C'''**) ist die zytologische Ko-Lokalisation von β PS1 Integrin (grün) mit CAP (rot) an den Z-Scheiben (Pfeile) und den Zell-Zell-Kontaktstellen (Pfeilköpfe) der Kardiomyozyten gezeigt. Maßstab: 10 μ m.

Dadurch konnte ich zeigen, dass CAP im adulten Dorsalgefäß nahe den Zell-Zell-Kontaktstellen sowie an den Z-Scheiben der Sarkomere und des ventralen longitudinalen Muskels lokalisiert ist (Abbildung 25A-A''',B-B''',C-C''').

3.2.10 Das adulte Dorsalgefäß von CAP-Mutanten weist fehlangeordnete Kardiomyozyten und Veränderungen in der Anordnung der Myofibrillen auf

In dem adulten Dorsalgefäß von Wildtyp-Fliegen sind die kontralateralen Kardiomyozyten sehr regelmäßig angeordnet, so dass die Zellkerne der Kardiomyozyten sich gegenüberliegen (Abbildung 26A und schematische Darstellung). Zudem verlaufen die zirkulären Myofibrillen der Kardiomyozyten in einem rechten Winkel zu den Zell-Zell-Kontaktstellen (Abbildung 26A'-A''). Im Vergleich zum Wildtyp konnte ich in den CAP mutanten Dorsalgefäßen Defekte nachweisen (Abbildung 26B). Solche Dorsalgefäße weisen vereinzelt fehlangeordnete Kardiomyozyten auf (Abbildung 26B; weißer Pfeilkopf und schematische Darstellung). Darüber hinaus konnte ich in den Regionen, in denen die Anordnungsdefekte der Kardiomyozyten zu beobachten sind, auch Veränderungen in der β PS1 Integrin Lokalisation (Abbildung 26B', gelbe Pfeilköpfe) und im Verlauf der zirkulären Myofibrillen feststellen (Abbildung 26B'', rote Pfeile). Meine Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Fehlanordnung der Kardiomyozyten und die Störung der Myofibrillenausrichtung eine Ursache für die beobachteten Kontraktionsstörungen sein könnten.

CAP könnte aufgrund seiner komplexen Struktur und der diversen potentiellen Protein-Proteininteraktionen die Herzkontraktilität auch anderweitig beeinflussen. Für die vollständige Aufklärung der Funktion von CAP im adulten Dorsalgefäß sind weiterführende Experimente notwendig (siehe Diskussion), die jedoch über den Umfang dieser Arbeit hinausgehen.



4 Diskussion

4.1 Der *in situ* Screen identifizierte neue Gene, die im embryonalen Dorsalgefäß von *Drosophila* exprimiert sind

Um neue Gene zu identifizieren, die während der Entwicklung des Dorsalgefäßes von *Drosophila* eine Rolle spielen, habe ich einen *in situ* Screen von Kandidatengenen durchgeführt, die aus einer Reihe von Genen ausgewählt wurden, die spezifisch im Herzen von Zebrafisch exprimiert waren (*Phd thesis* Florian Priller, 2011). Die Frage, die sich stellte, war ob die im Zebrafischherzen exprimierten Gene auch während der Entwicklung des Dorsalgefäßes von *Drosophila* eine Rolle spielen und demnach potentiell wichtige Gene für die Herzentwicklung darstellen. Von den 101 getesteten Genen konnte ich zeigen, dass 20 Kandidatengene im embryonalen Dorsalgefäß von *Drosophila* exprimiert sind. Im Vergleich mit der BDGP-Datenbank konnte ich alle dort aufgeführten Gene, die im Dorsalgefäß exprimiert sind, bestätigen. Zudem führte der von mir durchgeführte *in situ* Screen zur Aufdeckung neuer im Dorsalgefäß exprimierter Gene, da für 17 der 20 Kandidatengene bisher noch keine Expressionsdaten im Dorsalgefäß dokumentiert wurden (siehe Tabelle 15).

Unter den identifizierten Genen waren mehrere, die für Myosin-bindende Proteine kodieren bzw. mit nicht-muskulären Myosin II assoziiert sind. Das nicht-muskuläre Myosin II ist ein Hexamer, das aus zwei schweren Ketten Myosin (MHC kodiert durch *zipper*), zwei leichten Ketten Myosin (kodiert durch *Mlc-c*) und zwei regulatorischen leichten Ketten Myosin (MRLC kodiert durch *sqh*) besteht. Die krafterzeugende Aktivität des Aktomyosins wird vor allem durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung der regulatorischen leichten Kette reguliert. Dabei erfolgt die Phosphorylierung unter anderem durch die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige MLC-Kinase, die in *Drosophila* durch das Gen *spaghetti squash activator* (*sqa*) kodiert wird. Die Inaktivierung des nicht-muskulären Myosin II erfolgt durch Dephosphorylierung der MRLC mittels einer Myosin-Phosphatase (Champagne et al., 2000; Edwards et al., 1995; Karess et al., 1991; Kiehart et al., 1989; Mizuno et al., 2002). In dem *in situ* Screen konnte ich nicht nur die Expression von *zipper* im Dorsalgefäß bestätigen, sondern auch die Expression der anderen Untereinheiten des nicht-muskulären Myosin II Hexamers, *spaghetti squash* (*sqh*) und *Mlc-c*, im Dorsalgefäß nachweisen (Abbildung 7A,B,D). Neben den Kernuntereinheiten des nicht-muskulären Myosin II konnte ich auch die Expression der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige MLC-Kinase (*sqa*)

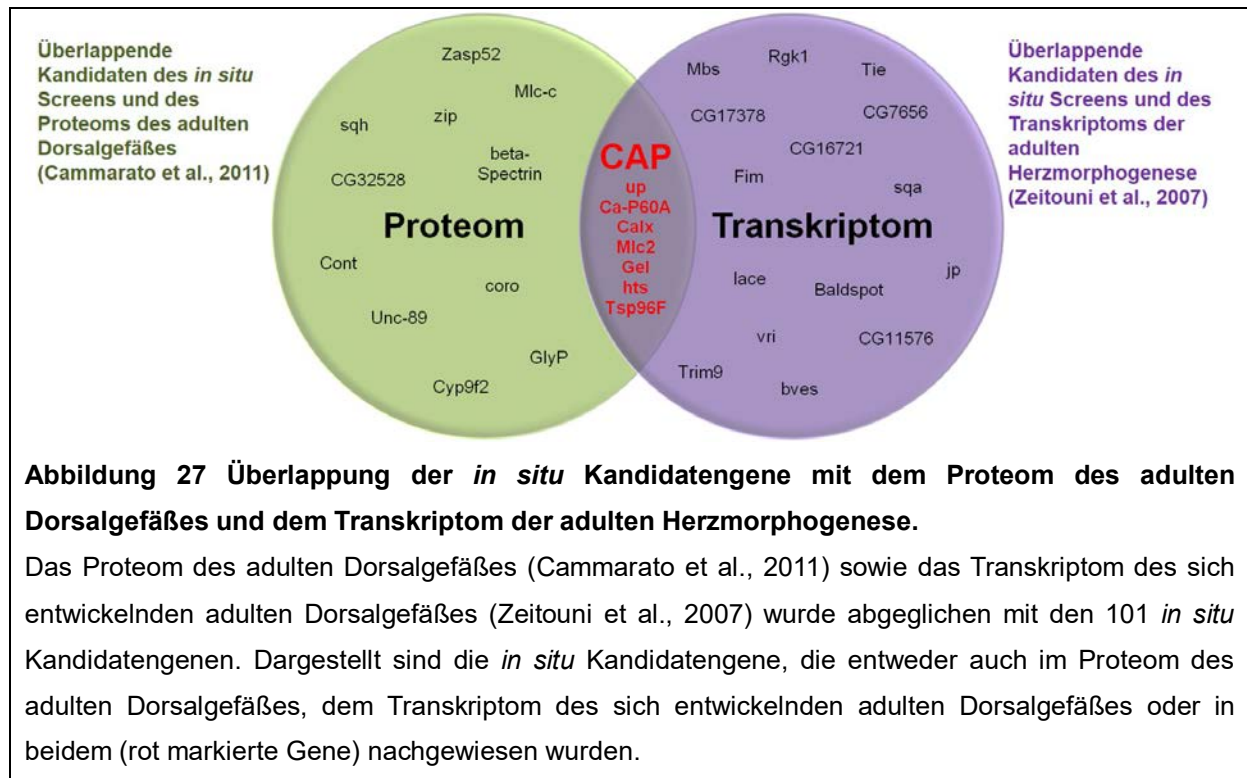
und der Myosin-bindenden Untereinheit (MBS kodiert von *Mbs*) der Myosin-Phosphatase im embryonalen Dorsalgefäß erstmalig zeigen (Abbildung 7C,P).

Interessanterweise wurde erst kürzlich die Rolle von Zipper bei der Lumenbildung im Zusammenhang mit der Rho-GTPase Cdc42 genauer untersucht (Vogler et al., 2014). Bisher war lediglich die Expression von *zipper* im embryonalen Dorsalgefäß gezeigt und ein Herzphänotyp von nicht-muskulären Myosin II Mutanten noch nicht beschrieben worden. Der Nachweis der Dorsalgefäßexpression der nicht-muskulären Myosin II Gene ist hierbei ein erster Schritt, um in weiterführenden Analysen die Rolle der nicht-muskulären Myosin II Proteine, der MLCK und der Myosin-Phosphatase während der Entwicklung des Dorsalgefäßes aufzuklären.

Interessant ist auch die Expression im Dorsalgefäß von Genen, die funktionell mit dem Aktinzytoskelett assoziiert sind wie beispielsweise *Fim* oder *Sip1* (Abbildung 7L,M). Ein weiteres dieser Gene ist *pico*, das für das einzige *Drosophila* Ortholog der Vertebraten MRL-Proteine kodiert und unter anderem an der Organisation der Aktinfilamente durch Interaktion mit Proteinen wie Ena/VASP beteiligt ist (Abbildung 6Q; Lyulcheva et al., 2008).

Unter den von mir untersuchten Genen waren auch *Ca-P60A* (*SERCA*) und *Calx*, die für Calciumionenkanäle bzw. -austauscher kodieren. Dabei ist die adulte Herzfunktion von *SERCA* bereits dokumentiert, während ein Herz-Phänotyp in *Calx*-Mutanten noch nicht beschrieben wurde (Abraham und Wolf, 2013). Unbekannt war jedoch für beide Gene, ob sie bereits embryonal im Dorsalgefäß exprimiert werden. Demnach konnte ich erstmals die Expression von *Ca-P60A* und *Calx* im embryonalen Dorsalgefäß nachweisen (Abbildung 7E,H).

Auf den ersten Blick erscheint der Nachweis einer Expression im Dorsalgefäß bei 20 von 101 Kandidatengenen gering. Da in der systematischen Analyse der Expressionsmuster allerdings nur embryonale Dorsalgefäße untersucht wurden, besteht die Möglichkeit, dass manche Gene zu einem späteren Zeitpunkt der Herzentwicklung eine Rolle spielen und beispielsweise erst im larvalen oder adulten Dorsalgefäß exprimiert werden.



So zeigt der Vergleich der 101 *in situ* Kandidatengene mit dem Proteom des adulten Dorsalgefäßes (Cammarato et al., 2011) 19 Übereinstimmungen. Von diesen 19 Genen konnte ich für 8 Gene (*CAP*, *Ca-P60A*, *Calx*, *Mlc2*, *Mlc-c*, *zip*, *sqh* und *Zasp52*) die Expression im embryonalen Dorsalgefäß zeigen (Abbildung 27; grüner Kreis). Die anderen 11 Gene scheinen erst zu einem späteren Zeitpunkt der Herzmorphogenese benötigt zu werden. Ein ähnlicher Vergleich wurde mit dem Transkriptom der adulten Herzmorphogenese durchgeführt (Zeitouni et al., 2007). Von den 1660 Genen, deren Transkriptionslevel sich signifikant während der adulten Herzmorphogenese ändert, waren 23 dieser Gene Kandidaten des *in situ* Screens und davon 7 Gene (*CAP*, *Ca-P60A*, *Calx*, *sqh*, *Mbs*, *Fim* und *CG16721*) im embryonalen Dorsalgefäß exprimiert (Abbildung 27; violetter Kreis).

Abschließend sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass das in meiner Arbeit untersuchte *Drosophila* CAP zu den Kandidaten gehört, die sowohl in der Proteomstudie als auch in der Transkriptomstudie nachgewiesen wurden (Abbildung 27).

4.2 CAP ist wichtig für die Entwicklung und Funktion des Dorsalgefäßes

Die Untersuchung von *Drosophila* CAP in Bezug auf seine Expression und Funktion während der Entwicklung des Dorsalgefäßes führten zu folgenden Ergebnissen:

- 1) Das *Drosophila* CAP Gen ist im embryonalen Dorsalgefäß exprimiert.
- 2) CAP ist embryonal an der Zellmembran der Kardioblasten und später an den Z-Scheiben und den Zell-Zell-Kontaktstellen der Kardiomyozyten lokalisiert.
- 3) Der Verlust von CAP führt zu
 - a. Anordnungsdefekten und einer erhöhten Zellzahl der Kardioblasten.
 - b. Defekten bei der Ausbildung eines Herzlumens.
 - c. Defekten in der Verteilung der luminalen Marker Slit und β PS1 Integrin.
 - d. Kontraktionsstörungen im adulten Dorsalgefäß.
- 4) CAP interagiert während der embryonalen Herzentwicklung mit dem α PS3 Integrinrezeptor und dem aktinbindenden Protein Talin.

In den folgenden Kapiteln werde ich die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse diskutieren.

4.2.1 Das *Drosophila* CAP und die Vertebraten SOHO-Proteine sind im Herzen exprimiert

4.2.1.1 Vergleich der Expression von dem *Drosophila* CAP und den Vertebraten SORBS Genen

In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass CAP in dem embryonalen Dorsalgefäß von *Drosophila* exprimiert wird und damit auch die Expressionsdaten der BDGP-Datenbank bestätigen. Es war in der BDGP-Datenbank jedoch nicht ersichtlich, wann die Expression von CAP im embryonalen Dorsalgefäß beginnt und ob die 23 verschiedenen CAP-Transkripte sich wohlmöglich in ihrer Expression unterscheiden. Mit dem Ziel, die bestehenden *in situ* Daten der BDGP-Datenbank zu erweitern, nutzte ich eine antisense RNA-Sonde, die auch das CAP-P Transkript detektieren konnte. Dadurch war es mir möglich erstmalig zu zeigen, dass die CAP

Expression im embryonalen Dorsalgefäß im Embryonalstadium 14 beginnt (Abbildung 9). In diesem Entwicklungsstadium haben sich die Herzvorläuferzellen bereits in bilateralen Reihen angeordnet und beginnen in Richtung der dorsalen Mittellinie zu migrieren. Zudem gelang es mir mit meiner antisense RNA-Probe Unterschiede zu den bisher dokumentierten Expressionsmustern nachzuweisen. Im Gegensatz zu der BDGP-Datenbank konnte ich keine Expression in den ventralen und dorsolateralen sensorischen Komplexen, der Kopfepidermis oder den Anlagen des sensorischen Nervensystems feststellen. So scheinen die CAP-Transkripte (CAP-X, CAP-A; CAP-Y, CAP-P, CAP-L; CAP-V und CAP-Q), die ich mit der in dieser Arbeit verwendeten *in situ* Probe detektieren konnte, in diesen Organen nicht exprimiert zu sein. Dahingegen war es mir möglich eine Expression in der Pharynxmuskulatur und dem anterioren und posterioren Mitteldarm zu zeigen. Dies deutet darauf hin, dass es zwischen den CAP-Transkripten Unterschiede in der Expression gibt. Aufgrund der Komplexität des CAP-Genlocus erweist sich jedoch die Analyse der Expressionen der einzelnen CAP-Transkripte als sehr schwierig.

Ein ähnlich komplexes Bild ergibt sich bei der Betrachtung der humanen Gene, die für die SoHo-Proteine CAP/Ponsin (*SORBS1*), ArgBP2 (*SORBS2*) und Vinexin (*SORBS3*) kodieren. Alternatives Splicing dieser Gene resultiert in der Expression vieler gewebs- und entwicklungsspezifischer Isoformen. So gilt beispielsweise das humane *SORBS1* Gen mit seinen 34 Exons, als eines der Gene mit der höchsten Anzahl an Splicevarianten (Lin et al., 2001a). Im Einklang mit der von mir detektierten Expression des *Drosophila CAP* Gens in dem embryonalen Dorsalgefäß, sind die *SORBS* Gene bei Vertebraten auch im embryonalen Herzen exprimiert (Kawauchi et al., 2001; Kioka et al., 1999; Mandai et al., 1999; Ribon et al., 1998a; Wang et al., 1997). Eine *in situ* Studie des *SORBS3* Gens, das unter anderem für Vinexin- α und Vinexin- β kodiert, konnte eine Expression im murinen Herzen ab dem Embryonalstadium E8.5 nachweisen. In dem Embryonalstadium E8.5 ist der lineare Herzschlauch ausgebildet und die Schleifenbildung des Herzens ist bereits initiiert (Buckingham et al., 2005). Zu erwähnen ist hierbei auch die unterschiedliche Expression der beiden Vinexin-Isoformen. Während die Expression von *Vinexin- β* (verkürzte Isoform; siehe Abbildung 6) ubiquitär ist, ist *Vinexin- α* spezifisch im atrioventrikulären Kanal und dem Ausflusstrakt des embryonalen murinen Herzens exprimiert (Kawauchi et al., 2001). Eine weitere Studie belegte zudem die *SORBS3*

Expression im Ventrikel des murinen Herzens im Embryonalstadium E14.5 (Diez-Roux et al., 2011).

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass die Herzexpression von dem *Drosophila* CAP bis hin zu den Vertebraten *SORBS* Genen evolutionär konserviert ist. Des Weiteren gibt es sowohl in *Drosophila* als auch in den Vertebraten gewebs- und entwicklungsspezifische Expressionsunterschiede der einzelnen CAP-Transkripte, deren Analyse jedoch bereits in *Drosophila* aufgrund der hohen Komplexität des Genlocus erschwert ist.

4.2.1.2 Das *Drosophila* CAP Protein ist wie die SoHo-Proteine im Herzen lokalisiert

In meiner Arbeit habe ich auch erstmals die Lokalisation des CAP-Proteins im Dorsalgefäß genauer untersucht. Der dafür hergestellte Antikörper gegen die CAP-N/E Isoform des *Drosophila* CAP-Proteins bestätigte kürzlich veröffentlichte Daten von Bharadwaj et al. (2013), die gezeigt hatten, dass CAP im Dorsalgefäß sowie den Muskelanheftungsstellen und den chordotonalen Organen des Embryos exprimiert ist (Abbildung 11A-D; Bharadwaj et al., 2013). Die genaue Lokalisation von CAP im embryonalen Dorsalgefäß oder die Funktion während der Herzentwicklung wurden in der erwähnten Studie jedoch nicht weiter untersucht.

Meine Arbeit liefert erstmals eine detaillierte Beschreibung der CAP Expression im Dorsalgefäß während der gesamten Entwicklung vom Embryo bis zur adulten Fliege. Ich konnte zeigen, dass CAP als zytoplasmatisches Protein embryonal in den peripheren Membranbereichen der Kardioblasten lokalisiert ist (Abbildung 12B). Ich vermute daher, dass CAP eine Rolle bei Zell-Zell und Zell-Matrix Adhäsionen spielt. Meine Vermutung wird untermauert durch Ergebnisse, die für die Vertebraten SoHo-Proteinfamilie demonstriert wurden. So wurde die Lokalisation der SoHo-Proteine Vinexin, ArgBP2 und CAP/Ponsin in den Fokalen Adhäsionskontakten gezeigt (Kioka et al., 1999; Mandai et al., 1999; Ribon et al., 1998a; Zhang et al., 2006). Proteine der Integrinfamilie sind Hauptbestandteile von fokalen Adhäsionskontakten, die die Verbindung zwischen der Extrazellulären Matrix und dem Aktinzytoskelett der Zelle herstellen. In der Tat konnte ich nicht nur eine zytologische Ko-Lokalisation von CAP mit der β PS1-Untereinheit des Integrinrezeptors im embryonalen Dorsalgefäß nachweisen (Abbildung 16I), sondern

auch die genetische Interaktion mit Proteinen der fokalen Adhäsionskontakte (α PS3 Integrin und Talin) zeigen (Abbildung 19).

Im larvalen Dorsalgefäß ist CAP an den Zell-Zell-Kontaktstellen der Kardiomyozyten (Abbildung 24A) und im adulten Dorsalgefäß zusätzlich an den Z-Scheiben der Kardiomyozyten nachweisbar (Abbildung 25). Weiterhin konnte ich die zytologische Ko-Lokalisation von CAP und β PS1 Integrin auch im adulten Dorsalgefäß an den Z-Scheiben und den Zell-Zell-Kontaktstellen der Kardiomyozyten zeigen. Die Expression von CAP an den Zell-Zell-Kontaktstellen und Z-Scheiben der Kardiomyozyten des adulten Dorsalgefäßes von *Drosophila* ist übereinstimmend mit der Lokalisation der Vertebraten SoHo-Proteine. So ist ArgBP2 an den Costameren und den Glanzstreifen der Kardiomyozyten lokalisiert (Sanger et al., 2010). Auch CAP/Ponsin wurde an den Glanzstreifen und den lateralen Membranen von Kardiomyozyten der Maus detektiert (Zhang et al., 2007). Auf die mögliche Bedeutung der CAP Expression im adulten Dorsalgefäß werde ich im Kapitel 4.2.3 eingehen.

Ein weiterer faszinierender Befund in Bezug auf die Lokalisation des CAP-Proteins ist die Expression von CAP in den larvalen und adulten Perikardialzellen, während CAP in embryonalen Perikardialzellen nicht nachweisbar ist. Interessanterweise ist auch β PS1 Integrin in den Perikardialzellen von Larven und adulten Fliegen exprimiert. Ein Verlust der Integrinfunktion führt im Embryo zu einem Ablösen der Perikardialzellen von den Kardioblasten und zu einer Fehllokalisierung des EZM-Proteins Pericardin (Stark et al., 1997; Vanderploeg et al., 2012). Ein ähnlicher Phänotyp ist auch in den larvalen und adulten Dorsalgefäßen von *loh*-Mutanten sichtbar. Das ADAMTS-ähnliche Protein Lonely heart. (*Loh*) agiert als sekretierter Pericardin-Rezeptor. Der beschriebene Verlust der Herzintegrität in *loh*-Mutanten resultiert in einem veränderten Myofibrillenverlauf sowie Kontraktionsstörungen des Dorsalgefäßes (Drechsler et al., 2013). Bisher ist nicht bekannt, ob *Loh* auch mit Integrinsignalkomponenten interagiert oder inwieweit eine Herunterregulierung der Integrinfunktion im adulten Dorsalgefäß zu ähnlichen Defekten führt. Die CAP Expression in den Perikardialzellen deutet jedoch darauf hin, dass CAP bei diesen Prozessen auch eine Rolle spielt. Embryonal konnte ich in den *CAP*-Mutanten keine auffälligen Veränderungen in der Lokalisation von Pericardin oder eine Ablösung der Perikardialzellen feststellen (Daten nicht gezeigt). Es wäre äußerst interessant zu

untersuchen, ob ein möglicher Phänotyp in larvalen und adulten Dorsalgefäßen von *CAP*-Mutanten detektierbar ist.

4.2.2 Mögliche Rolle von CAP und Integrinen während der embryonalen Herzentwicklung

4.2.2.1 CAP-Mutanten weisen ähnliche Defekte des embryonalen Dorsalgefäßes auf wie Integrinmutanten

Wie bereits erwähnt konnte ich in meiner Arbeit nicht nur die zytologische Ko-Lokalisation von CAP und β PS1 Integrin zeigen, sondern auch die genetische Interaktion von CAP mit Proteinen des Integrinsignalwegs während der Herzentwicklung.

Integrine vermitteln die Zell-Matrix-Verbindungen und spielen eine wichtige Rolle bei zellulären Prozessen wie Zellmigration, Zellformveränderungen und Signalweiterleitung (Brown et al., 2000; Delon und Brown, 2007; Hynes, 2002; Ross und Borg, 2001). Im Dorsalgefäß von *Drosophila* bestehen die Integrinrezeptoren aus einer Untereinheit β PS1 Integrin, kodiert durch *mys*, und einer Untereinheit α PS3 Integrin, kodiert durch *scb* (Stark et al., 1997). Bisher ist erst wenig über die Rolle von Integrinen während der Entwicklung des Dorsalgefäßes in *Drosophila* bekannt. Vanderploeg et al. (2012) zeigten, dass Integrine benötigt werden, um den Robo-Liganden Slit an der luminalen Membran zu lokalisieren und zu stabilisieren. Integrinmutanten zeigten dabei neben Veränderungen in der Verteilung von Slit auch Defekte in der Ausbildung eines Herzlumens (Vanderploeg et al., 2012).

Ähnliche Defekte konnte ich in meiner Arbeit auch bei *CAP*-Mutanten beobachten.

4.2.2.1.1 CAP als Regulator der Zellproliferation und Zelladhäsion: mögliche Ursachen für die Anordnungsdefekte und die erhöhte Zahl der Kardioblasten

Defekte, die ich bei *CAP*-Mutanten in dem embryonalen Dorsalgefäß detektieren konnte, waren neben Anordnungsdefekten der Kardioblasten auch eine Erhöhung der Zellzahl der Kardioblasten (Abbildung 13). Anordnungsdefekte in Form von Lücken, Verklumpungen oder Drehungen von Kardioblasten wurden auch für Mutanten der Integrinrezeptoren als auch für zytoplasmatische Integrin Effektoren gezeigt (Vanderploeg et al., 2012). Eine Erhöhung der Kardioblastenzellzahl wurde zuvor aber noch nicht dokumentiert.

Ergänzend dazu konnte ich in den von mir durchgeführten genetischen Interaktionsexperimenten, nicht nur die Interaktion von *CAP* mit *scb* (kodiert für α PS3 Integrin) und *rhea* (kodiert für Talin) während der Entwicklung des Dorsalgefäßes zeigen, sondern auch erstmals eine erhöhte Zellzahl der Kardioblasten in den transheterozygoten Mutanten nachweisen (Abbildung 19). Dies kann aber auch darin begründet sein, dass es bisher keine vergleichbaren Daten zu der Zellzahl der Kardioblasten in Integrinmutanten gibt. Da die Erhöhung der Zellzahl, der vor allem Tinman exprimierenden Kardioblasten, nicht besonders ausgeprägt ist, könnte dies bisher auch übersehen bzw. als reiner Anordnungsdefekt interpretiert worden sein.

Demnach wäre der nächste Schritt zu klären, ob es auch in homozygoten Mutanten von beispielsweise β PS1 Integrin, α PS3 Integrin oder den aktinbindenden Integrin Effektoren Talin und Vinculin zu einer veränderten Kardioblastenzellzahl kommt.

Da die *CAP* Expression erst im Embryonalstadium 14 beginnt, stellt sich die Frage, wie es zu der leicht erhöhten Anzahl an Kardioblasten kommt. Dabei sind verschiedene Erklärungen denkbar.

Das *CAP*-Protein wurde in *Drosophila* als Interaktionspartner der Wnt-Signalproteine Axin und Arrow identifiziert (Yamazaki und Nusse, 2002; Yamazaki und Yanagawa, 2003). Der Wingless-Signalweg spielt, wie in der Einleitung erwähnt, eine wichtige Rolle bei der Spezifizierung des kardialen Mesoderms. Es wäre demnach denkbar, dass in *CAP*-Mutanten nicht kardiogene Zellen zu einem kardialen Zellschicksal durch eine Wg-Aktivierung angeregt werden. Gegen diese Theorie spricht jedoch die erst im Stadium 14 einsetzende Expression von *CAP*, wohingegen die Phase der finalen Proliferation der Herzvorläuferzellen bereits in den Embryonalstadien 10-12 stattfindet. Zudem zeigten Yamazaki und Yanagawa (2003), dass die Überexpression von *CAP* den kanonischen Wg-Signalweg nicht beeinflusst (Yamazaki und Yanagawa, 2003). Man kann jedoch nicht ausschließen, dass die Interaktion von *CAP* mit Axin und Arrow eine Rolle spielt, die bisher noch nicht bekannt ist.

Die leichte Erhöhung der Kardioblastenzahl in den *CAP*-Mutanten könnte auch damit zusammenhängen, dass *CAP* die Notch-Aktivität in manchen Zellen beeinflusst. Der Notch-Signalweg wird während der Entwicklung des Dorsalgefäßes benötigt, um zunächst die Anzahl der kardialen Vorläuferzellen zu begrenzen (laterale Inhibition) und im zweiten Schritt während der asymmetrischen Zellteilungen

die weitere Differenzierung der kardialen Vorläuferzellen zu regulieren. Grigorian et al. zeigten, dass die Kardioblasten, die aus dem kardialen Cluster separiert werden, den Notch-Liganden Delta akkumulieren und so benachbarte Zellen im kardialen Cluster daran hindern, auch zu Kardioblasten zu differenzieren (Grigorian et al., 2011). In Mutanten für Delta differenzieren alle Zellen des kardiogenen Zellclusters zu Kardioblasten (Grigorian et al., 2011). Es wäre demnach denkbar, dass CAP die Notch-Aktivität verändert, indem es die Anzahl der Delta-Moleküle beeinflusst, so dass weitere Zellen des kardialen Zellclusters zu Kardioblasten differenzieren.

Um dies zu überprüfen, könnte man versuchen Unterschiede in der Expression des Notch-Liganden Delta mit Hilfe eines anti-Delta Antikörpers zu detektieren. Da jedoch die Erhöhung der Kardioblastenzahl eher gering ist und auch nicht jedes Hemisegment des Dorsalgefäßes betroffen ist, muss man davon ausgehen, dass solche Unterschiede in der Delta Expression eher schwach und damit schwer nachweisbar wären.

Da auch der RTK/MAPK-Signalweg eine Rolle bei den Zellteilungen der Herzvorläuferzellen spielt, wäre es zudem denkbar, dass auch dieser in den CAP-Mutanten beeinträchtigt ist. So zeigten Grigorian et al., dass die Aktivierung des RKT/MAPK-Signalwegs durch EGFR und FGFR für die Spezifizierung und Aufrechterhaltung des kardialen Mesoderms notwendig ist und die räumliche Begrenzung von Delta auf die Kardioblasten steuert (Grigorian et al., 2011). Die Überexpression eines konstitutiv aktiven RAS mittels *Mef2-Gal4* führte zu einer Erhöhung der Kardioblastenzellzahl und zur Akkumulation von Delta in Mef2 positiven Muskelzellen (Grigorian et al., 2011).

Da das Vertebraten SoHo-Protein CAP/Ponsin die Aktivierung des MAPK-Signalwegs negativ reguliert (Zhang et al., 2006) und zudem die Bindung der SoHo-Proteine an Signalkomponenten des MAPK-Signalwegs beschrieben wurde (Roignot und Soubeyran, 2009), wäre eine ähnliche Funktion für das *Drosophila* CAP denkbar. Die späte CAP Expression könnte in diesem Fall für die Stabilität und Begrenzung der Delta Expression notwendig sein. Für CAP-Mutanten würde das bedeuten, dass es zu einer Aktivierung des RTK/MAPK-Signalwegs und damit zu einer Erhöhung der Delta Expression kommt. Diese Dysbalancen könnten dazu führen, dass weitere Zellen des kardialen Mesoderms aufgrund der erhöhten Delta Expression zu Kardioblasten differenzieren.

An dieser Stelle sei erwähnt, dass bei der Regulierung des RTK/MAPK-Signalwegs auch die Interaktion von CAP mit Flotillinen in *Lipid Rafts* eine Rolle spielen könnte. Tomasovic et al. konnten nachweisen, dass das Vertebraten CAP/Ponsin als auch Flotilin-1 an FRS2 binden. Dabei wird vermutet, dass die Bindung von CAP/Ponsin und Flotillin-1 an FRS2 kompetitiv ist. Bei FRS2 handelt es sich um ein Adapterprotein, das an phosphorylierte RTKs bindet. Tomasovic et al halten es für wahrscheinlich, dass durch die Interaktion von FRS2 mit CAP/Flotillin-1 der RTK/MAPK-Signalweg reguliert wird. (Tomasovic et al., 2012). In CAP-Mutanten würde es demnach zu einem Ungleichgewicht dieser Interaktionen kommen, wodurch die Aktivität des RTK/MAPK-Signalwegs beeinflusst werden würde.

Ein entscheidender Aspekt, der bei der Bewertung der erhaltenen CAP Phänotypen bedacht werden sollte, ist, dass es sich bei den beiden CAP-Mutanten um antimorphe Allele zu handeln scheint. Vergleicht man die in Tabelle 16 aufgeführten Statistiken des beobachteten Herzdefekts, so wird deutlich, dass die Penetranz des Phänotyps in den homozygoten CAP-Mutanten höher ist als in den transheterozygoten CAP-Mutanten über der CAP-Defizienzlinie oder in der homozygoten Defizienzlinie. Antimorphe Allele, auch als dominant negative Mutationen bezeichnet, weisen ein verändertes Genprodukt auf, das sich antagonistisch zu dem Wildtyp-Allel verhält. So vermute ich, dass in den CAP-Mutanten weiterhin verkürzte Transkripte einiger Isoformen entstehen, die mit den vorhanden anti-CAP Antikörpern (diese Arbeit und Bharadwaj et al., 2013) nicht nachgewiesen werden können. Dafür sprechen auch meine kürzlich erzielten Ergebnisse, die noch bestätigt werden müssen und daher nicht mehr in diese Arbeit mit aufgenommen werden konnten. So war es mir möglich mit der cDNA der beiden CAP-Mutanten und mit genspezifischen Oligonukleotiden, die außerhalb der deletierten Region binden, Amplifikate zu erhalten. Dies würde zumindest bedeuten, dass trotz der C-terminalen Deletionen der CAP-Mutanten weiterhin Transkripte gebildet werden, die möglicherweise auch zu verkürzten bzw. veränderten Proteinen translatiert werden könnten. Um das Auftreten solcher verkürzter Proteine nachzuweisen, wäre es für weitere Analysen hilfreich noch einen N-terminal bindenden Antikörper herzustellen, dessen Antigensequenz außerhalb des Bereiches der Deletionen der CAP-Mutanten liegt.

Auch eine mögliche Expression des CAP-P Transkriptes muss berücksichtigt werden, da dessen Transkription höchstwahrscheinlich in den *CAP*-Mutanten nicht gestört ist und das CAP-P Protein ebenfalls mit den derzeit verfügbaren Antikörpern nicht detektiert werden kann.

4.2.2.1.2 CAP als Verbindung zwischen Aktinzytoskelett und der Extrazellulären Matrix: mögliche Ursachen für die beobachteten Lumendefekte

Die in *CAP*-Mutanten beobachteten Anordnungsdefekte der Kardioblasten führten zu der Vermutung, dass es auch Defekte im Herzlumen geben könnte, die bereits in ähnlicher Form für Mutanten des Robo/Slit-Signalwegs, des Unc5/NetrinB-Signalwegs und für Integrinmutanten beschrieben wurde (Albrecht et al., 2011; Santiago-Martínez et al., 2006; Vanderploeg et al., 2012).

Ich konnte zeigen, dass in *CAP*-Mutanten die Bildung eines Herzlumens gestört ist. Dabei traten die beobachteten Lumendefekte auch in Bereichen des Dorsalgefäßes auf, an denen keine zusätzlichen bzw. fehlangeordneten Kardioblasten detektierbar waren (Abbildung 14). Diese Beobachtung spricht dafür, dass die Lumendefekte durchaus als unabhängig von der erhöhten Kardioblastenzahl und den Anordnungsdefekten zu betrachten sind.

Meine Analysen zeigten weiterhin, dass die Kardioblasten in *CAP*-Mutanten normal zur dorsalen Mittellinie migrieren und die kontralateralen Kardioblasten J-Domänen und eine luminale Basalmembran ausbilden (Abbildung 15). Daher gehe ich davon aus, dass CAP prinzipiell keine entscheidende Rolle bei der Zellmigration oder der Ausbildung der Polarität der Kardioblasten hat. Die beschriebenen Phänotypen und vor allem die verringerte Krümmung der luminalen Membran, lassen eher vermuten, dass CAP eine Rolle bei den Remodellierungsprozessen des Zytoskeletts spielt.

Da CAP sowohl an das Aktinzytoskelett als auch an Integrinkomponenten wie beispielsweise Vinculin bindet (Zhang et al., 2006), wäre es denkbar, dass CAP bei dem Prozess der Lumenbildung eine wichtige Verbindungsstelle bei der Signalweiterleitung von der Extrazellulären Matrix zu dem Aktinzytoskelett darstellt. In *CAP*-Mutanten könnte diese Verbindung gestört sein, so dass wichtige Zellformveränderungen, die bei der Lumenbildung stattfinden, unterbleiben bzw. nur begrenzt erfolgen.

Diesbezüglich wurde im Flügepithel demonstriert, dass ein Verlust der Integrinfunktion zu Veränderungen der Zellform und zu einer fehlerhaften Verteilung und/oder Zusammensetzung der Extrazellulären Matrix führt. Dabei wurde auch der RKT/MAPK-Signalweg als potenzieller Regulator dieses Prozesses identifiziert (Domínguez-Giménez et al., 2007). Wie bereits im vorangegangenen Unterkapitel erwähnt, ist eine Rolle von *Drosophila* CAP bei der Regulierung RKT/MAPK-Signalwegs sehr wahrscheinlich.

Dementsprechend könnte CAP wie bereits vermutet die Weiterleitung der Signale von der Extrazellulären Matrix zum Aktinzytoskelett während der Lumenbildung beeinflussen. Diese Annahme wird durch folgende Beobachtungen unterstützt: (1) die zytologische Ko-Lokalisation von CAP und β PS1 Integrin im embryonalen und adulten Dorsalgefäß (Abbildung 16 und Abbildung 25), (2) eine weniger distinkte Verteilung von Slit und β PS1 Integrin an der L-Domäne in CAP-Mutanten (Abbildung 17), und (3) die genetischen Interaktionen zwischen CAP und Genen, die für Proteine des Integrin-Signalwegs kodieren (Abbildung 19).

Zusammenfassend zeigen meine Daten, dass CAP essentiell für die Ausbildung eines Herzlumens im Embryo ist. Weitere Experimente sind notwendig, um die molekularen Details aufzuklären durch die CAP mit dem Integrin-Signalweg und anderen Proteinen während der Lumenbildung verbunden ist. Ein erster Ansatzpunkt wäre dabei, die beobachteten Lumendefekte der CAP-Mutanten in direkten Zusammenhang zu den Lumendefekten von Integrinmutanten zu bringen. Dabei könnte man beispielsweise transheterozygote Mutanten von *CAP^{49e}* und *scb²* sowie *CAP^{49e}* und *rhea¹* auf Lumendefekte untersuchen.

Des Weiteren wäre es erforderlich den Zusammenhang von CAP und dem RKT/MAPK-Signalweg während der Lumenbildung, aber auch in Bezug auf die erhöhte Kardioblastenzahl aufzuklären. Betreffend der erhöhten Kardioblastenzahl wäre es dabei sinnvoll, die Anzahl der Perikardialzellen in CAP-Mutanten zu überprüfen. Würde es in den Zellen des kardialen Mesoderms zu einer Reduktion der Notch-Aktivität kommen, so müsste neben der Erhöhung der Kardioblastenzellzahl eine Verringerung der Perikardialzellzahl nachzuweisen sein. Im Falle einer Aktivierung des RKT/MAPK-Signalwegs wären dagegen sowohl die Kardioblasten, als auch die Perikardialzellen in ihrer Anzahl erhöht.

4.2.3 CAP ist wichtig für die Ausbildung eines funktionalen Herzsyznzytiums

In larvalen und adulten Dorsalgefäßen ko-lokalisiert CAP zytologisch mit β PS1 Integrin an den Z-Scheiben und den Zell-Zell-Kontaktstellen. β PS1 Integrin ist an den Costameren lokalisiert und stellt die Verbindung der Z-Scheiben mit der Extrazellulären Matrix her. Zudem ist β PS1 Integrin auch an den longitudinalen Zell-Zell-Kontaktstellen der kontralateralen Kardiomyozyten nachweisbar (Nishimura et al., 2014). Diese Strukturen scheinen in den *CAP*-Mutanten generell unverändert, jedoch konnte ich einen irregulären Verlauf der Zell-Zell-Kontaktstellen zwischen den Kardiomyozyten sowie auch partiell einen veränderten Verlauf der zirkulären Myofibrillen zeigen (Abbildung 26). Da diese Anomalitäten vorwiegend in Bereichen fehlangeordneter Kardiomyozyten auftreten, vermute ich, dass die beobachteten Defekte die Konsequenz der bereits im embryonalen Dorsalgefäß falsch positionierten Zellen sind.

CAP könnte auch das kontraktile Verhalten des adulten Dorsalgefäßes beeinflussen, indem es als Verbindung zwischen dem Aktinzytoskelett und den Integrinen an den Zell-Zell-Kontaktstellen fungiert. In diesem Kontext wäre auch ein Einfluss von CAP bei der Ausrichtung der zirkulären Myofibrillen denkbar. Dafür spricht auch die Hochregulation von *CAP* zum Ende der puppalen Stadien (42h APF und 48h APF) (Zeitouni et al., 2007). Es wurde gezeigt, dass genau zu diesem Zeitpunkt die Bildung und Ausrichtung der zirkulären Myofibrillen, des adulten Dorsalgefäßes erfolgt (Hellbach, 2014).

Es ist sehr wahrscheinlich, dass die in *CAP*-Mutanten auftretende anormale Myofibrillenausrichtung die Kontraktilität des Dorsalgefäßes beeinträchtigt und höchstwahrscheinlich auch die Ursache für die von mir beobachtete reduzierte systolische Verkürzungsfraction (Abbildung 20) als auch für das verringerte kardiale Pumpvermögen (Abbildung 21) darstellt.

Ähnliche kardiale Phänotypen sowie das Auftreten von Arrhythmien wurden erst kürzlich bei der transkriptionellen Herunterregulierung der Integrin-gebundenen Kinase (ILK) im Dorsalgefäß beschrieben (Nishimura et al., 2014).

Da die Beeinträchtigung der Herzfunktion eine reduzierte Lebenserwartung zu Folge haben kann (Melkani et al., 2011; Neely et al., 2010), führte ich in meiner Arbeit auch Lebensdauer-Tests durch. Dabei habe ich kontroverse Daten in Bezug auf die *CAP*-Mutanten und die *CAP-RNAi* Experimente erhalten. So konnte ich die in

CAP-Mutanten beobachtete verkürzte Lebensdauer durch *CAP-RNAi* Experimente nicht belegen (Abbildung 23).

Eine mögliche Erklärung des Widerspruchs ist, dass die Effizienz der verwendeten *UAS-CAP-RNAi* Linie nicht explizit mit den im Experiment genutzten Treiberlinien, sondern mit der ubiquitären *daGal4* Treiberlinie getestet wurde (Abbildung 22). Darüber hinaus muss der dominant-negative Charakter der *CAP*-Mutanten bei der Interpretation der Experimente berücksichtigt werden. Dennoch ist es notwendig die Testung der *CAP-RNAi* Effizienz mit den im Experiment verwendeten Treiberlinien (*twistGal4*; *how²⁴BGal4* und *tinDGal4*; *tinc^{Δ4}Gal4*) zu wiederholen, bevor man eine endgültige Bewertung dieser Versuche vornehmen kann.

Jedoch zeigen meine Daten, dass CAP im adulten Dorsalgefäß von *Drosophila* benötigt wird, um ein funktionelles Herzsyzytiums auszubilden.

Da die Vertebraten SoHo-Proteine sowie auch das *Drosophila* CAP-Protein als Adapterproteine mit ihren C-terminalen SH3-Domanen nicht nur wie bereits beschrieben an Vinculin und Paxillin binden, sondern auch mit vielen Signalkomponenten interagieren, kann ich weitere Funktionen von CAP im adulten Dorsalgefäß nicht ausschließen. Zum vollen Verständnis der kardialen CAP Funktion, sind daher weitere Experimente notwendig, die jedoch über den Umfang dieser Arbeit hinausgingen. Solche Analysen am einfacher aufgebauten Dorsalgefäß von *Drosophila* könnten helfen, die Funktionsweise von CAP und den SoHo-Proteinen bei der Entwicklung des Herzens besser zu verstehen.

5 Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente gewähren einen ersten Einblick in die Funktionsweise des CAP-Proteins während der Entwicklung des Dorsalgefäßes von *Drosophila melanogaster* und stellen damit die Grundlage für nun weiterführende funktionelle Analysen dar.

Neben den beispielsweise bereits in der Diskussion erwähnten Interaktionsstudien mit weiteren Integrin-Signalwegsmolekülen und dem Zusammenhang von CAP und dem RKT/MAPK-Signalweg, wäre es auch sehr interessant die Funktion von CAP bei Zell-Zell-Adhäsionen zu untersuchen. Denn wie die CAP Lokalisation im embryonalen Dorsalgefäß zeigt, ist CAP auch an den lateralen peripheren Membranbereichen zu detektieren (Abbildung 12).

Von besonderem Interesse sind vor allem funktionelle Analysen zur adulten Herzfunktion von CAP beispielsweise auch unter Stressbedingungen (wie Nahrungsmangel, fettreiche Nahrung, Nahrung mit hohem Zuckergehalt). Während der letzten Jahre avancierte *Drosophila* zu einem geeigneten Modell zur Untersuchung von Fettleibigkeit und dem metabolischen Syndrom, die mit einem erhöhten Risiko für lipotoxische Kardiomyopathie in Verbindung stehen (Birse und Bodmer, 2011; Birse et al., 2010; Lim und Bodmer; Luong et al., 2006). Birse et al. zeigten beispielsweise, dass Fliegen, die auf fettreicher Nahrung gehalten wurden erhöhte Fettwerte und Veränderungen der Insulin/Glukose-Homöostase aufweisen. Dabei verursachte die fettreiche Ernährung die Akkumulation von Lipiden im Dorsalgefäß, eine verminderte Kontraktilität sowie Leitungsblockaden und strukturelle Pathologien, die mit Symptomen einer diabetischen Kardiomyopathie vergleichbar sind (Birse et al., 2010).

Ferner etablierten Na et al. in der adulten Fliege ein Modell, mit dem man durch chronisch hohe Zuckergabe induzierte Herzerkrankungen untersuchen kann (Na et al., 2013).

Diese Modelle sind in Hinblick auf eine mögliche weitere Funktion von CAP innerhalb des insulinstimulierten Glukosetransports interessant. So wurde das *Drosophila* CAP Protein von Yamazaki et al., als ein *Drosophila*-Homolog eines regulatorischen Glukosetransport-Komplexes erstmals beschrieben (Yamazaki und Nüsse, 2002). Zudem identifizierte man das Vertebraten SoHo-Protein CAP/Ponsin als ein wichtiges Signalmolekül in der insulinstimulierten Glukoseaufnahme (Baumann et al., 2000;

Ribon et al., 1998b). Darüber hinaus wurde auf dem *SORBS1* Gen des humanen Chromosoms 10q23-q24 ein Einzelnukleotid-Polymorphismus (*SNP: single nucleotide polymorphism*) identifiziert, der eine signifikante Assoziation mit menschlicher Fettleibigkeit und Typ -2-Diabetes zeigte (Lin et al., 2001b).

6 Literaturverzeichnis

- Abraham, D. M. and Wolf, M. J.** (2013). Disruption of sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase function in *Drosophila* leads to cardiac dysfunction. *PLoS One* **8**, e77785.
- Akasaka, T., Klinedinst, S., Ocorr, K., Bustamante, E. L., Kim, S. K. and Bodmer, R.** (2006). The ATP-sensitive potassium (KATP) channel-encoded dSUR gene is required for *Drosophila* heart function and is regulated by tinman. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 11999–2004.
- Albrecht, S., Altenhein, B. and Paululat, A.** (2011). The transmembrane receptor Uncoordinated5 (Unc5) is essential for heart lumen formation in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **350**, 89–100.
- Alvarez, A. D., Shi, W., Wilson, B. A. and Skeath, J. B.** (2003). pannier and pointedP2 act sequentially to regulate *Drosophila* heart development. *Development* **130**, 3015–3026.
- Azpiazu, N. and Frasch, M.** (1993). tinman and bagpipe: two homeo box genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of *Drosophila*. *Genes Dev.* **7**, 1325–40.
- Azpiazu, N., Lawrence, P. A., Vincent, J. P. and Frasch, M.** (1996). Segmentation and specification of the *Drosophila* mesoderm. *Genes Dev.* **10**, 3183–3194.
- Baker, N. E.** (1987). Molecular cloning of sequences from wingless, a segment polarity gene in *Drosophila*: the spatial distribution of a transcript in embryos. *EMBO J.* **6**, 1765–1773.
- Baker, R. and Schubiger, G.** (1996). Autonomous and nonautonomous Notch functions for embryonic muscle and epidermis development in *Drosophila*. *Development* **122**, 617–26.
- Bate, M. and Arias, A.** (1993). *The development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Baumann, C. A., Ribon, V., Kanzaki, M., Thurmond, D. C., Mora, S., Shigematsu, S., Bickel, P. E., Pessin, J. E. and Saltiel, A. R.** (2000). CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature* **407**, 202–7.
- Baylies, M. K. and Bate, M.** (1996). twist: a myogenic switch in *Drosophila*. *Science* **272**, 1481–1484.
- Baylies, M. K., Martinez Arias, A. and Bate, M.** (1995). wingless is required for the formation of a subset of muscle founder cells during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **121**, 3829–3837.

- Beiman, M., Shilo, B. Z. and Volk, T.** (1996). Heartless, a Drosophila FGF receptor homolog, is essential for cell migration and establishment of several mesodermal lineages. *Genes Dev.* **10**, 2993–3002.
- Bharadwaj, R., Roy, M., Ohyama, T., Sivan-Loukianova, E., Delannoy, M., Lloyd, T. E., Zlatic, M., Eberl, D. F. and Kolodkin, A. L.** (2013). Cbl-associated protein regulates assembly and function of two tension-sensing structures in Drosophila. *Development* **140**, 627–38.
- Bier, E. and Bodmer, R.** (2004). Drosophila, an emerging model for cardiac disease. *Gene* **342**, 1–11.
- Birse, R. T. and Bodmer, R.** (2011). Lipotoxicity and cardiac dysfunction in mammals and Drosophila. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **46**, 376–85.
- Birse, R. T., Choi, J., Reardon, K., Rodriguez, J., Graham, S., Diop, S., Ocorr, K., Bodmer, R. and Oldham, S.** (2010). High-fat-diet-induced obesity and heart dysfunction are regulated by the TOR pathway in Drosophila. *Cell Metab.* **12**, 533–44.
- Bodmer, R.** (1993). The gene tinman is required for specification of the heart and visceral muscles in Drosophila. *Development* **118**, 719–729.
- Bodmer, R.** (2004). Heart development in Drosophila and its relationship to vertebrates. *Trends Cardiovasc. Med.* **5**, 21–28.
- Bodmer, R. and Frasch, M.** (2010). Development and Aging of the Drosophila Heart. In *Heart Development and Regeneration*, pp. 47–86.
- Bodmer, R. and Venkatesh, T. V.** (1998). Heart Development in Drosophila and Vertebrates : *Dev. Genet.* **22**, 181–186.
- Boulay, J. L., Dennefeld, C. and Alberga, A.** The Drosophila developmental gene snail encodes a protein with nucleic acid binding fingers. *Nature* **330**, 395–8.
- Bour, B. A., O'Brien, M. A., Lockwood, W. L., Goldstein, E. S., Bodmer, R., Taghert, P. H., Abmayr, S. M. and Nguyen, H. T.** (1995). Drosophila MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis. *Genes Dev.* **9**, 730–41.
- Brand, a H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401–15.
- Brown, N. H., Gregory, S. L. and Martin-Bermudo, M. D.** (2000). Integrins as mediators of morphogenesis in Drosophila. *Dev. Biol.* **223**, 1–16.
- Buckingham, M., Meilhac, S. and Zaffran, S.** (2005). Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 826–35.
- Buday, L.** (1999). Membrane-targeting of signalling molecules by SH2/SH3 domain-containing adaptor proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1422**, 187–204.

- Buszczak, M., Paterno, S., Lighthouse, D., Bachman, J., Planck, J., Owen, S., Skora, A. D., Nystul, T. G., Ohlstein, B., Allen, A., et al.** (2007). The carnegie protein trap library: a versatile tool for *Drosophila* developmental studies. *Genetics* **175**, 1505–31.
- Cammarato, A., Ahrens, C. H., Alayari, N. N., Qeli, E., Rucker, J., Reedy, M. C., Zmasek, C. M., Gucek, M., Cole, R. N., Van Eyk, J. E., et al.** (2011). A mighty small heart: the cardiac proteome of adult *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* **6**, e18497.
- Carmena, A., Buff, E., Halfon, M. S., Gisselbrecht, S., Jiménez, F., Baylies, M. K. and Michelson, A. M.** (2002). Reciprocal regulatory interactions between the Notch and Ras signaling pathways in the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Dev. Biol.* **244**, 226–242.
- Cestra, G., Toomre, D., Chang, S. and De Camilli, P.** (2005). The Abl/Arg substrate ArgBP2/nArgBP2 coordinates the function of multiple regulatory mechanisms converging on the actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 1731–6.
- Champagne, M. B., Edwards, K. A., Erickson, H. P. and Kiehart, D. P.** (2000). *Drosophila* stretchin-MLCK is a novel member of the Titin/Myosin light chain kinase family. *J. Mol. Biol.* **300**, 759–77.
- Charpin, G., Chikh-Issa, A. R., Guignard, H., Jourdan, G., Dumas, C., Pansu, D. and Descroix-Vagne, M.** (1992). Effect of sorbin on duodenal absorption of water and electrolytes in the rat. *Gastroenterology* **103**, 1568–73.
- Chartier, A., Zaffran, S., Astier, M., Sémériva, M. and Gratecos, D.** (2002). Pericardin, a *Drosophila* type IV collagen-like protein is involved in the morphogenesis and maintenance of the heart epithelium during dorsal ectoderm closure. *Development* **129**, 3241–53.
- Clark, E. A. and Brugge, J. S.** (1995). Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* **268**, 233–239.
- Cowan, C. A. and Henkemeyer, M.** (2001). The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals. *Nature* **413**, 174–9.
- Curtis, N. J., Ringo, J. M. and Dowse, H. B.** (1999). Morphology of the pupal heart, adult heart, and associated tissues in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *J. Morphol.* **240**, 225–35.
- Das, D., Aradhya, R., Ashoka, D. and Inamdar, M.** (2008). Post-embryonic pericardial cells of *Drosophila* are required for overcoming toxic stress but not for cardiac function or adult development. *Cell Tissue Res.* **331**, 565–570.
- De Velasco, B., Shen, J., Go, S. and Hartenstein, V.** (2004). Embryonic development of the *Drosophila* corpus cardiacum, a neuroendocrine gland with similarity to the vertebrate pituitary, is controlled by sine oculis and glass. *Dev. Biol.* **274**, 280–294.

- Delon, I. and Brown, N. H.** (2007). Integrins and the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 43–50.
- Diez-Roux, G., Banfi, S., Sultan, M., Geffers, L., Anand, S., Rozado, D., Magen, A., Canidio, E., Pagani, M., Peluso, I., et al.** (2011). A high-resolution anatomical atlas of the transcriptome in the mouse embryo. *PLoS Biol.* **9**, e1000582.
- Domínguez-Giménez, P., Brown, N. H. and Martín-Bermudo, M. D.** (2007). Integrin-ECM interactions regulate the changes in cell shape driving the morphogenesis of the *Drosophila* wing epithelium. *J. Cell Sci.* **120**, 1061–1071.
- Drechsler, M., Schmidt, A. C., Meyer, H. and Paululat, A.** (2013). The conserved ADAMTS-like protein lonely heart mediates matrix formation and cardiac tissue integrity. *PLoS Genet.* **9**, e1003616.
- Edwards, K. A., Chang, X. J. and Kiehart, D. P.** (1995). Essential light chain of *Drosophila* nonmuscle myosin II. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **16**, 491–8.
- Frasch, M.** (1995). Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal Dpp in the early *Drosophila* embryo. *Nature* **374**, 464–7.
- Frémion, F., Astier, M., Zaffran, S., Guillén, A., Homburger, V. and Sémériva, M.** (1999). The heterotrimeric protein Go is required for the formation of heart epithelium in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **145**, 1063–76.
- Gajewski, K., Kim, Y., Lee, Y. M., Olson, E. N. and Schulz, R. A.** (1997). D-mef2 is a target for Tinman activation during *Drosophila* heart development. *EMBO J.* **16**, 515–522.
- Gajewski, K., Fossett, N., Molkentin, J. D. and Schulz, R. a** (1999). The zinc finger proteins Pannier and GATA4 function as cardiogenic factors in *Drosophila*. *Development* **126**, 5679–88.
- Gajewski, K., Choi, C. Y., Kim, Y. and Schulz, R. A.** (2000). Genetically distinct cardiac cells within the *Drosophila* heart. *Genesis* **28**, 36–43.
- Gajewski, K., Zhang, Q., Choi, C. Y., Fossett, N., Dang, a, Kim, Y. H., Kim, Y. and Schulz, R. a** (2001). Pannier is a transcriptional target and partner of Tinman during *Drosophila* cardiogenesis. *Dev. Biol.* **233**, 425–36.
- Gehmlich, K., Hayess, K., Legler, C., Haebel, S., Van der Ven, P. F. M., Ehler, E. and Fürst, D. O.** (2010). Ponsin interacts with Nck adapter proteins: implications for a role in cytoskeletal remodelling during differentiation of skeletal muscle cells. *Eur. J. Cell Biol.* **89**, 351–364.
- Geiger, B. and Bershadsky, A.** (2001). Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 584–592.
- Gisselbrecht, S., Skeath, J. B., Doe, C. Q. and Michelson, A. M.** (1996). heartless encodes a fibroblast growth factor receptor (DFR1/DFGF-R2) involved in the

- directional migration of early mesodermal cells in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* **10**, 3003–3017.
- Gorchakov, A. A., Kaltenhäuser, J., Eggert, H. and Saumweber, H.** [Construction of pMH, a convenient *Escherichia coli* protein expression vector]. *Mol. Biol. (Mosk)*. **38**, 713–6.
- Grigorian, M., Mandal, L., Hakimi, M., Ortiz, I. and Hartenstein, V.** (2011). The convergence of Notch and MAPK signaling specifies the blood progenitor fate in the *Drosophila* mesoderm. *Dev. Biol.* **353**, 105–118.
- Haag, T. a, Haag, N. P., Lekven, a C. and Hartenstein, V.** (1999). The role of cell adhesion molecules in *Drosophila* heart morphogenesis: faint sausage, shotgun/DE-cadherin, and laminin A are required for discrete stages in heart development. *Dev. Biol.* **208**, 56–69.
- Haglund, K., Ivankovic-Dikic, I., Shimokawa, N., Kruh, G. D. and Dikic, I.** (2004). Recruitment of Pyk2 and Cbl to lipid rafts mediates signals important for actin reorganization in growing neurites. *J. Cell Sci.* **117**, 2557–2568.
- Han, Z. and Bodmer, R.** (2003). Myogenic cells fates are antagonized by Notch only in asymmetric lineages of the *Drosophila* heart, with or without cell division. *Development* **130**, 3039–51.
- Han, Z. and Olson, E. N.** (2005). Hand is a direct target of Tinman and GATA factors during *Drosophila* cardiogenesis and hematopoiesis. *Development* **132**, 3525–36.
- Han, Z., Fujioka, M., Su, M., Liu, M., Jaynes, J. B. and Bodmer, R.** (2002). Transcriptional integration of competence modulated by mutual repression generates cell-type specificity within the cardiogenic mesoderm. *Dev. Biol.* **252**, 225–40.
- Harden, N., Ricos, M., Ong, Y. M., Chia, W. and Lim, L.** (1999). Participation of small GTPases in dorsal closure of the *Drosophila* embryo: distinct roles for Rho subfamily proteins in epithelial morphogenesis. *J. Cell Sci.* **112 (Pt 3)**, 273–284.
- Harpaz, N., Ordan, E., Ocorr, K., Bodmer, R. and Volk, T.** (2013). Multiplexin promotes heart but not aorta morphogenesis by polarized enhancement of slit/robo activity at the heart lumen. *PLoS Genet.* **9**, e1003597.
- Hartenstein, V.** (1993). *Atlas of Drosophila development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Harvie, P. D., Filippova, M. and Bryant, P. J.** (1998). Genes expressed in the ring gland, the major endocrine organ of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **149**, 217–31.
- Hellbach, A.** (2014). Dlg1 is required for myofibrillar arrangement in the *Drosophila* heart. LMU München., Diss., 2014.

- Hendren, J. D., Shah, A. P., Arguelles, A. M. and Cripps, R. M.** (2007). Cardiac expression of the *Drosophila* Sulphonylurea receptor gene is regulated by an intron enhancer dependent upon the NK homeodomain factor Tinman. *Mech. Dev.* **124**, 416–26.
- Hollfelder, D., Frasch, M. and Reim, I.** (2014). Distinct functions of the laminin β LN domain and collagen IV during cardiac extracellular matrix formation and stabilization of alary muscle attachments revealed by EMS mutagenesis in *Drosophila*. *BMC Dev. Biol.* **14**, 26.
- Holz, A., Bossinger, B., Strasser, T., Janning, W. and Klapper, R.** (2003). The two origins of hemocytes in *Drosophila*. *Development* **130**, 4955–62.
- Hudson, A. M., Petrella, L. N., Tanaka, A. J. and Cooley, L.** (2008). Mononuclear muscle cells in *Drosophila* ovaries revealed by GFP protein traps. *Dev. Biol.* **314**, 329–40.
- Hynes, R. O.** (2002). Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673–687.
- Iruela-Arispe, M. L. and Davis, G. E.** (2009). Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation. *Dev. Cell* **16**, 222–31.
- Jagla, T., Bidet, Y., Da Ponte, J. P., Dastugue, B. and Jagla, K.** (2002). Cross-repressive interactions of identity genes are essential for proper specification of cardiac and muscular fates in *Drosophila*. *Development* **129**, 1037–47.
- Jiang, J., Kosman, D., Ip, Y. T. and Levine, M.** (1991). The dorsal morphogen gradient regulates the mesoderm determinant twist in early *Drosophila* embryos. *Genes Dev.* **5**, 1881–1891.
- Kakimoto, Y., Ito, S., Abiru, H., Kotani, H., Ozeki, M., Tamaki, K. and Tsuruyama, T.** (2013). Sorbin and SH3 domain-containing protein 2 is released from infarcted heart in the very early phase: proteomic analysis of cardiac tissues from patients. *J. Am. Heart Assoc.* **2**, e000565.
- Kamei, M., Saunders, W. B., Bayless, K. J., Dye, L., Davis, G. E. and Weinstein, B. M.** (2006). Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo. *Nature* **442**, 453–6.
- Kaneko, T., Li, L. and Li, S. S.-C.** (2008). The SH3 domain--a family of versatile peptide- and protein-recognition module. *Front. Biosci.* **13**, 4938–52.
- Karess, R. E., Chang, X. J., Edwards, K. A., Kulkarni, S., Aguilera, I. and Kiehart, D. P.** (1991). The regulatory light chain of nonmuscle myosin is encoded by spaghetti-squash, a gene required for cytokinesis in *Drosophila*. *Cell* **65**, 1177–89.
- Kawabe, H., Hata, Y., Takeuchi, M., Ide, N., Mizoguchi, A. and Takai, Y.** (1999). nArgBP2, a novel neural member of ponsin/ArgBP2/vinexin family that interacts

with synapse-associated protein 90/postsynaptic density-95- associated protein (SAPAP). *J. Biol. Chem.* **274**, 30914–30918.

Kawauchi, T., Ikeya, M., Takada, S., Ueda, K., Shirai, M., Takihara, Y., Kioka, N. and Amachi, T. (2001). Expression of vinexin alpha in the dorsal half of the eye and in the cardiac outflow tract and atrioventricular canal. *Mech. Dev.* **106**, 147–50.

Kerman, B. E., Cheshire, A. M. and Andrew, D. J. (2006). From fate to function: the *Drosophila* trachea and salivary gland as models for tubulogenesis. *Differentiation*. **74**, 326–48.

Kiehart, D. P., Lutz, M. S., Chan, D., Ketchum, A. S., Laymon, R. A., Nguyen, B. and Goldstein, L. S. (1989). Identification of the gene for fly non-muscle myosin heavy chain: *Drosophila* myosin heavy chains are encoded by a gene family. *EMBO J.* **8**, 913–22.

Kimura, A., Baumann, C. A., Chiang, S. H. and Saltiel, A. R. (2001). The sorbin homology domain: a motif for the targeting of proteins to lipid rafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9098–9103.

Kioka, N., Sakata, S., Kawauchi, T., Amachi, T., Akiyama, S. K., Okazaki, K., Yaen, C., Yamada, K. M. and Aota, S. I. (1999). Vinexin: a novel vinculin-binding protein with multiple SH3 domains enhances actin cytoskeletal organization. *J. Cell Biol.* **144**, 59–69.

Kioka, N., Ueda, K. and Amachi, T. (2002). Vinexin, CAP/ponsin, ArgBP2: a novel adaptor protein family regulating cytoskeletal organization and signal transduction. *Cell Struct. Funct.* **27**, 1–7.

Kioka, N., Ito, T., Yamashita, H., Uekawa, N., Umemoto, T., Motoyoshi, S., Imai, H., Takahashi, K., Watanabe, H., Yamada, M., et al. (2010). Crucial role of vinexin for keratinocyte migration in vitro and epidermal wound healing in vivo. *Exp. Cell Res.* **316**, 1728–38.

Klinedinst, S. L. and Bodmer, R. (2003). Gata factor Pannier is required to establish competence for heart progenitor formation. *Development* **130**, 3027–3038.

Kosman, D., Ip, Y. T., Levine, M. and Arora, K. (1991). Establishment of the mesoderm-neuroectoderm boundary in the *Drosophila* embryo. *Science* **254**, 118–22.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–5.

Lai, E. C. (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* **131**, 965–973.

- Lalevée, N., Monier, B., Sénatore, S., Perrin, L. and Sémériva, M.** (2006). Control of cardiac rhythm by ORK1, a *Drosophila* two-pore domain potassium channel. *Curr. Biol.* **16**, 1502–8.
- Lee, H. H. and Frasch, M.** (2000). Wingless effects mesoderm patterning and ectoderm segmentation events via induction of its downstream target sloppy paired. *Development* **127**, 5497–508.
- Leptin, M.** (1991). twist and snail as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. *Genes Dev.* **5**, 1568–76.
- Leptin, M. and Grunewald, B.** (1990). Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Development* **110**, 73–84.
- Lim, H.-Y. and Bodmer, R.** Phospholipid homeostasis and lipotoxic cardiomyopathy: a matter of balance. *Fly (Austin)*. **5**, 234–6.
- Lin, W. H., Huang, C. J., Liu, M. W., Chang, H. M., Chen, Y. J., Tai, T. Y. and Chuang, L. M.** (2001a). Cloning, mapping, and characterization of the human sorbin and SH3 domain containing 1 (SORBS1) gene: a protein associated with c-Abl during insulin signaling in the hepatoma cell line Hep3B. *Genomics* **74**, 12–20.
- Lin, W. H., Chiu, K. C., Chang, H. M., Lee, K. C., Tai, T. Y. and Chuang, L. M.** (2001b). Molecular scanning of the human sorbin and SH3-domain-containing-1 (SORBS1) gene: positive association of the T228A polymorphism with obesity and type 2 diabetes. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1753–60.
- Liu, J., Qian, L., Wessells, R. J., Bidet, Y., Jagla, K. and Bodmer, R.** (2006). Hedgehog and RAS pathways cooperate in the anterior-posterior specification and positioning of cardiac progenitor cells. *Dev. Biol.* **290**, 373–85.
- Lo, S. H.** (2006). Focal adhesions: What's new inside. *Dev. Biol.* **294**, 280–291.
- Lo, P. C. H. and Frasch, M.** (2001). A role for the COUP-TF-related gene seven-up in the diversification of cardioblast identities in the dorsal vessel of *Drosophila*. *Mech. Dev.* **104**, 49–60.
- Lo, P. C. H. and Frasch, M.** (2003). Establishing A-P polarity in the embryonic heart tube: a conserved function of Hox genes in *Drosophila* and vertebrates? *Trends Cardiovasc. Med.* **13**, 182–7.
- Lo, P. C. H. H., Skeath, J. B., Gajewski, K., Schulz, R. A. and Frasch, M.** (2002). Homeotic genes autonomously specify the anteroposterior subdivision of the *Drosophila* dorsal vessel into aorta and heart. *Dev. Biol.* **251**, 307–319.
- Lockwood, W. K. and Bodmer, R.** (2002). The patterns of wingless, decapentaplegic, and tinman position the *Drosophila* heart. *Mech. Dev.* **114**, 13–26.

- Lovato, T. L., Nguyen, T. P., Molina, M. R. and Cripps, R. M.** (2002). The Hox gene abdominal-A specifies heart cell fate in the *Drosophila* dorsal vessel. *Development* **129**, 5019–27.
- Lu, Y. and Settleman, J.** (1999). The *Drosophila* Pkn protein kinase is a Rho/Rac effector target required for dorsal closure during embryogenesis. *Genes Dev.* **13**, 1168–1180.
- Luong, N., Davies, C. R., Wessells, R. J., Graham, S. M., King, M. T., Veech, R., Bodmer, R. and Oldham, S. M.** (2006). Activated FOXO-mediated insulin resistance is blocked by reduction of TOR activity. *Cell Metab.* **4**, 133–42.
- Lyons, I., Parsons, L. M., Hartley, L., Li, R., Andrews, J. E., Robb, L. and Harvey, R. P.** (1995). Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene *Nkx2-5*. *Genes Dev.* **9**, 1654–1666.
- Lyulcheva, E., Taylor, E., Michael, M., Vehlow, A., Tan, S., Fletcher, A., Krause, M. and Bennett, D.** (2008). *Drosophila* pico and its mammalian ortholog lamellipodin activate serum response factor and promote cell proliferation. *Dev. Cell* **15**, 680–90.
- MacMullin, A. and Jacobs, J. R.** (2006). Slit coordinates cardiac morphogenesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **293**, 154–164.
- Magie, C. R., Meyer, M. R., Gorsuch, M. S. and Parkhurst, S. M.** (1999). Mutations in the Rho1 small GTPase disrupt morphogenesis and segmentation during early *Drosophila* development. *Development* **126**, 5353–5364.
- Mandai, K., Nakanishi, H., Satoh, A., Takahashi, K., Satoh, K., Nishioka, H., Mizoguchi, A. and Takai, Y.** (1999). Ponsin / SH3P12 : An I-Afadin – and Vinculin-binding Protein Localized at. **144**, 1001–1018.
- Mandal, L., Banerjee, U. and Hartenstein, V.** (2004). Evidence for a fruit fly hemangioblast and similarities between lymph-gland hematopoiesis in fruit fly and mammal aorta-gonadal-mesonephros mesoderm. *Nat. Genet.* **36**, 1019–23.
- Mann, T., Bodmer, R. and Pandur, P.** (2009). The *Drosophila* homolog of vertebrate *Islet1* is a key component in early cardiogenesis. *Development* **136**, 317–26.
- Markstein, M., Markstein, P., Markstein, V. and Levine, M. S.** (2002). Genome-wide analysis of clustered Dorsal binding sites identifies putative target genes in the *Drosophila* embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 763–768.
- Martin, D., Zusman, S., Li, X., Williams, E. L., Khare, N., DaRocha, S., Chiquet-Ehrismann, R. and Baumgartner, S.** (1999). wing blister, a new *Drosophila* laminin alpha chain required for cell adhesion and migration during embryonic and imaginal development. *J. Cell Biol.* **145**, 191–201.
- Matsuyama, M., Mizusaki, H., Shimono, A., Mukai, T., Okumura, K., Abe, K., Shimada, K. and Morohashi, K.** (2005). A novel isoform of Vinexin, Vinexin

- gamma, regulates Sox9 gene expression through activation of MAPK cascade in mouse fetal gonad. *Genes Cells* **10**, 421–34.
- Mayer, B. J.** (2001). SH3 domains: complexity in moderation. *J. Cell Sci.* **114**, 1253–63.
- Medioni, C., Astier, M., Zmojdzian, M., Jagla, K. and Sémériva, M.** (2008). Genetic control of cell morphogenesis during *Drosophila melanogaster* cardiac tube formation. *J. Cell Biol.* **182**, 249–61.
- Melkani, G. C., Bodmer, R., Ocorr, K. and Bernstein, S. I.** (2011). The UNC-45 chaperone is critical for establishing myosin-based myofibrillar organization and cardiac contractility in the *Drosophila* heart model. *PLoS One* **6**, e22579.
- Mitsushima, M., Takahashi, H., Shishido, T., Ueda, K. and Kioka, N.** (2006). Abl kinase interacts with and phosphorylates vinexin. *FEBS Lett.* **580**, 4288–4295.
- Mizuno, T., Tsutsui, K. and Nishida, Y.** (2002). *Drosophila* myosin phosphatase and its role in dorsal closure. *Development* **129**, 1215–23.
- Mizutani, K., Ito, H., Iwamoto, I., Morishita, R., Deguchi, T., Nozawa, Y., Asano, T. and Nagata, K.-I.** (2007). Essential roles of ERK-mediated phosphorylation of vinexin in cell spreading, migration and anchorage-independent growth. *Oncogene* **26**, 7122–7131.
- Molina, M. R. and Cripps, R. M.** (2001). Ostia, the inflow tracts of the *Drosophila* heart, develop from a genetically distinct subset of cardiac cells. *Mech. Dev.* **109**, 51–9.
- Monier, B., Astier, M., Sémériva, M. and Perrin, L.** (2005). Steroid-dependent modification of Hox function drives myocyte reprogramming in the *Drosophila* heart. *Development* **132**, 5283–93.
- Morin, X., Daneman, R., Zavortink, M. and Chia, W.** (2001). A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 15050–5.
- Na, J., Musselman, L. P., Pendse, J., Baranski, T. J., Bodmer, R., Ocorr, K. and Cagan, R.** (2013). A *Drosophila* model of high sugar diet-induced cardiomyopathy. *PLoS Genet.* **9**, e1003175.
- Nasonkin, I., Alikasifoglu, A., Ambrose, C., Cahill, P., Cheng, M., Sarniak, A., Egan, M. and Thomas, P. M.** (1999). A novel sulfonylurea receptor family member expressed in the embryonic *Drosophila* dorsal vessel and tracheal system. *J. Biol. Chem.* **274**, 29420–5.
- Neely, G. G., Kuba, K., Cammarato, A., Isobe, K., Amann, S., Zhang, L., Murata, M., Elmén, L., Gupta, V., Arora, S., et al.** (2010). A global in vivo *Drosophila* RNAi screen identifies NOT3 as a conserved regulator of heart function. *Cell* **141**, 142–53.

- Nishimura, M., Kumsta, C., Kaushik, G., Diop, S. B., Ding, Y., Bisharat-Kernizan, J., Catan, H., Cammarato, A., Ross, R. S., Engler, A. J., et al.** (2014). A dual role for integrin-linked kinase and β 1-integrin in modulating cardiac aging. *Aging Cell*.
- Pan, D., Huang, J. D. and Courey, A. J.** (1991). Functional analysis of the *Drosophila* twist promoter reveals a dorsal-binding ventral activator region. *Genes Dev.* **5**, 1892–1901.
- Pansu, D., Vagne, M., Bosshard, A. and Mutt, V.** (1981). Sorbin, a peptide contained in porcine upper small intestine which induces the absorption of water and sodium in the rat duodenum. *Scand. J. Gastroenterol.* **16**, 193–9.
- Park, M., Wu, X., Golden, K., Axelrod, J. D. and Bodmer, R.** (1996). The wingless signaling pathway is directly involved in *Drosophila* heart development. *Dev. Biol.* **177**, 104–16.
- Pastor-Pareja, J. C. and Xu, T.** (2011). Shaping cells and organs in *Drosophila* by opposing roles of fat body-secreted Collagen IV and perlecan. *Dev. Cell* **21**, 245–56.
- Perrin, L., Monier, B., Ponzielli, R., Astier, M. and Semeriva, M.** (2004). *Drosophila* cardiac tube organogenesis requires multiple phases of Hox activity. *Dev. Biol.* **272**, 419–31.
- Ponzielli, R., Astier, M., Chartier, A., Gallet, A., Thérond, P. and Sémériva, M.** (2002). Heart tube patterning in *Drosophila* requires integration of axial and segmental information provided by the Bithorax Complex genes and hedgehog signaling. *Development* **129**, 4509–4521.
- Priller, F. C.** (2011). Identification of molecular mechanisms required for heart tube formation in the zebrafish *Danio rerio* through transcriptome profiling. Berlin, Humboldt-Univ., Diss., 2011.
- Qian, L., Liu, J. and Bodmer, R.** (2005a). Neuromancer Tbx20-related genes (H15/midline) promote cell fate specification and morphogenesis of the *Drosophila* heart. *Dev. Biol.* **279**, 509–24.
- Qian, L., Liu, J. and Bodmer, R.** (2005b). Slit and Robo control cardiac cell polarity and morphogenesis. *Curr. Biol.* **15**, 2271–8.
- Ranganayakulu, G., Schulz, R. A. and Olson, E. N.** (1996). Wingless signaling induces nautilus expression in the ventral mesoderm of the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.* **176**, 143–148.
- Reim, I. and Frasch, M.** (2005). The Dorsocross T-box genes are key components of the regulatory network controlling early cardiogenesis in *Drosophila*. *Development* **132**, 4911–25.
- Reim, I. and Frasch, M.** (2010). Genetic and genomic dissection of cardiogenesis in the *Drosophila* model. *Pediatr. Cardiol.* **31**, 325–34.

- Reim, I., Lee, H.-H. and Frasch, M.** (2003). The T-box-encoding Dorsocross genes function in amnioserosa development and the patterning of the dorsolateral germ band downstream of Dpp. *Development* **130**, 3187–204.
- Reim, I., Mohler, J. P. and Frasch, M.** (2005). Tbx20-related genes, mid and H15, are required for tinman expression, proper patterning, and normal differentiation of cardioblasts in *Drosophila*. *Mech. Dev.* **122**, 1056–69.
- Rembold, M., Ciglar, L., Yáñez-Cuna, J. O., Zinzen, R. P., Girardot, C., Jain, A., Welte, M. A., Stark, A., Leptin, M. and Furlong, E. E. M.** (2014). A conserved role for Snail as a potentiator of active transcription. *Genes Dev.* **28**, 167–81.
- Ribon, V., Herrera, R., Kay, B. K. and Saltiel, A. R.** (1998a). A Role for CAP , a Novel , Multifunctional Src Homology 3 Domain-containing Protein in Formation of Actin Stress Fibers and Focal Adhesions *. **273**, 4073–4080.
- Ribon, V., Printen, J. A., Hoffman, N. G., Kay, B. K. and Saltiel, A. R.** (1998b). A novel, multifunctional c-Cbl binding protein in insulin receptor signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 872–879.
- Riechmann, V., Irion, U., Wilson, R., Grosskortenhaus, R. and Leptin, M.** (1997). Control of cell fates and segmentation in the *Drosophila* mesoderm. *Development* **124**, 2915–2922.
- Rizki, T. M.** (1978). The circulatory system and associated cells and tissues. In *The Genetics and Biology of Drosophila*, pp. 397–452.
- Roignot, J. and Soubeyran, P.** (2009). ArgBP2 and the SoHo family of adapter proteins in oncogenic diseases. *Cell Adh. Migr.* **3**, 167–70.
- Ross, R. S. and Borg, T. K.** (2001). Integrins and the Myocardium. *Circ. Res.* **88**, 1112–1119.
- Rugendorff, A., Younossi-Hartenstein, A. and Hartenstein, V.** (1994). Embryonic origin and differentiation of the *Drosophila* heart. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **203**, 266–280.
- Rusch, J. and Levine, M.** (1996). Threshold responses to the dorsal regulatory gradient and the subdivision of primary tissue territories in the *Drosophila* embryo. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**, 416–23.
- Ryan, K. M., Hoshizaki, D. K. and Cripps, R. M.** (2005). Homeotic selector genes control the patterning of seven-up expressing cells in the *Drosophila* dorsal vessel. *Mech. Dev.* **122**, 1023–33.
- Ryan, K. M., Hendren, J. D., Helander, L. A. and Cripps, R. M.** (2007). The NK homeodomain transcription factor Tinman is a direct activator of seven-up in the *Drosophila* dorsal vessel. *Dev. Biol.* **302**, 694–702.
- Sambrook, J. and Russell, D. W.** (2001). Molecular Cloning - Sambrook & Russel - Vol. 1, 2, 3.pdf. *Hum. Mutat.* **18**, 1–2231.

- Sanger, J. M., Wang, J., Gleason, L. M., Chowrashi, P., Dube, D. K., Mittal, B., Zhukareva, V. and Sanger, J. W.** (2010). Arg/Abl-binding protein, a Z-body and Z-band protein, binds sarcomeric, costameric, and signaling molecules. *Cytoskeleton (Hoboken)*. **67**, 808–23.
- Santiago-Martínez, E., Soplop, N. H. and Kramer, S. G.** (2006). Lateral positioning at the dorsal midline: Slit and Roundabout receptors guide *Drosophila* heart cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 12441–6.
- Santiago-Martínez, E., Soplop, N. H., Patel, R. and Kramer, S. G.** (2008). Repulsion by Slit and Roundabout prevents Shotgun/E-cadherin-mediated cell adhesion during *Drosophila* heart tube lumen formation. *J. Cell Biol.* **182**, 241–8.
- Schaub, C., März, J., Reim, I. and Frasch, M.** (2015). Org-1-Dependent Lineage Reprogramming Generates the Ventral Longitudinal Musculature of the *Drosophila* Heart. *Curr. Biol.* **25**, 488–94.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al.** (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–82.
- Schwartz, M. A. and Shattil, S. J.** (2000). Signaling networks linking integrins and rho family GTPases. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 388–91.
- Schweisguth, F.** (2004). Regulation of Notch Signaling Activity. *Curr. Biol.* **14**,.
- Sellin, J., Albrecht, S., Kölsch, V. and Paululat, A.** (2006). Dynamics of heart differentiation, visualized utilizing heart enhancer elements of the *Drosophila melanogaster* bHLH transcription factor Hand. *Gene Expr. Patterns* **6**, 360–75.
- Simpson, P.** (1983). Maternal-Zygotic Gene Interactions during Formation of the Dorsoventral Pattern in *Drosophila* Embryos. *Genetics* **105**, 615–32.
- Soplop, N. H., Patel, R. and Kramer, S. G.** (2009). Preparation of embryos for electron microscopy of the *Drosophila* embryonic heart tube. *J. Vis. Exp.*
- Stark, K. A., Yee, G. H., Roote, C. E., Williams, E. L., Zusman, S. and Hynes, R. O.** (1997). A novel alpha integrin subunit associates with betaPS and functions in tissue morphogenesis and movement during *Drosophila* development. *Development* **124**, 4583–94.
- Stathopoulos, A. and Levine, M.** (2004). Whole-genome analysis of *Drosophila* gastrulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**, 477–484.
- Stathopoulos, A., Tam, B., Ronshaugen, M., Frasch, M. and Levine, M.** (2004). Pyramus and thisbe: FGF genes that pattern the mesoderm of *Drosophila* embryos. *Genes Dev.* **18**, 687–699.
- Strilić, B., Kucera, T., Eglinger, J., Hughes, M. R., McNagny, K. M., Tsukita, S., Dejana, E., Ferrara, N., Lammert, E. and Kučera, T.** (2009). The Molecular

- Basis of Vascular Lumen Formation in the Developing Mouse Aorta. *Dev. Cell* **17**, 505–515.
- Strilić, B., Kučera, T. and Lammert, E.** (2010). Formation of cardiovascular tubes in invertebrates and vertebrates. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 3209–3218.
- Swope, D., Kramer, J., King, T. R., Cheng, Y. S. and Kramer, S. G.** (2014). Cdc42 is required in a genetically distinct subset of cardiac cells during *Drosophila* dorsal vessel closure. *Dev. Biol.* **392**, 221–232.
- Takahashi, H., Mitsushima, M., Okada, N., Ito, T., Aizawa, S., Akahane, R., Umemoto, T., Ueda, K. and Kioka, N.** (2005). Role of interaction with vinculin in recruitment of vinexins to focal adhesions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **336**, 239–46.
- Tao, Y., Wang, J., Tokusumi, T., Gajewski, K. and Schulz, R. a** (2007). Requirement of the LIM homeodomain transcription factor tailup for normal heart and hematopoietic organ formation in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 3962–9.
- Tepass, U. and Hartenstein, V.** (1994). The development of cellular junctions in the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.* **161**, 563–596.
- Tepass, U., Theres, C. and Knust, E.** (1990). crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell* **61**, 787–799.
- Thisse, B., el Messal, M. and Perrin-Schmitt, F.** (1987). The twist gene: isolation of a *Drosophila* zygotic gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern. *Nucleic Acids Res.* **15**, 3439–53.
- Thisse, C., Perrin-Schmitt, F., Stoetzel, C. and Thisse, B.** (1991). Sequence-specific transactivation of the *Drosophila* twist gene by the dorsal gene product. *Cell* **65**, 1191–1201.
- Tögel, M., Pass, G. and Paululat, A.** (2008). The *Drosophila* wing hearts originate from pericardial cells and are essential for wing maturation. *Dev. Biol.* **318**, 29–37.
- Tomasovic, A., Kurrle, N., Banning, A. and Tikkanen, R.** (2012). Role of Cbl-associated protein/ponsin in receptor tyrosine kinase signaling and cell adhesion. *J. Mol. Biochem.* **1**,.
- Urbano, J. M., Torgler, C. N., Molnar, C., Tepass, U., López-Varea, A., Brown, N. H., de Celis, J. F. and Martín-Bermudo, M. D.** (2009). *Drosophila* laminins act as key regulators of basement membrane assembly and morphogenesis. *Development* **136**, 4165–76.
- Urbano, J. M., Domínguez-Giménez, P., Estrada, B. and Martín-Bermudo, M. D.** (2011). PS integrins and laminins: key regulators of cell migration during *Drosophila* embryogenesis. *PLoS One* **6**, e23893.

- Valaperti, A., Nishii, M., Liu, Y., Yang, H., Naito, K., Liu, P. P. and Eriksson, U.** (2014). The adapter protein c-Cbl-associated protein (CAP) protects from acute CVB3-mediated myocarditis through stabilization of type I interferon production and reduced cytotoxicity. *Basic Res. Cardiol.* **109**, 411.
- Vanderploeg, J., Vazquez Paz, L. L., MacMullin, A. and Jacobs, J. R.** (2012). Integrins are required for cardioblast polarisation in *Drosophila*. *BMC Dev. Biol.* **12**, 8.
- Vogler, G., Liu, J., Iafe, T. W., Migh, E., Mihaly, J. and Bodmer, R.** (2014). Cdc42 and formin activity control non-muscle myosin dynamics during *Drosophila* heart morphogenesis. *J. Cell Biol.* **206**, 909–922.
- Wang, B., Golemis, E. A. and Kruh, G. D.** (1997). ArgBP2, a multiple Src homology 3 domain-containing, Arg/Abl-interacting protein, is phosphorylated in v-Abl-transformed cells and localized in stress fibers and cardiocyte Z-disks. *J. Biol. Chem.* **272**, 17542–50.
- Wang, J., Tao, Y., Reim, I., Gajewski, K., Frasch, M. and Schulz, R. A.** (2005). Expression, Regulation, and Requirement of the Toll Transmembrane Protein during Dorsal Vessel Formation in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 4200–4210.
- Ward, E. J. and Skeath, J. B.** (2000). Characterization of a novel subset of cardiac cells and their progenitors in the *Drosophila* embryo. *Development* **127**, 4959–4969.
- Weavers, H., Prieto-Sánchez, S., Grawe, F., Garcia-López, A., Artero, R., Wilsch-Bräuninger, M., Ruiz-Gómez, M., Skaer, H. and Denholm, B.** (2009). The insect nephrocyte is a podocyte-like cell with a filtration slit diaphragm. *Nature* **457**, 322–326.
- Wilk, R., Murthy, S. U., Yan, H. and Krause, H. M.** (2010). In Situ Hybridization: Fruit Fly Embryos and Tissues. In *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. 4.9.3:9.3.1–9.3.24., .
- Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M. and Knust, E.** (1995). Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell* **82**, 67–76.
- Wolfstetter, G. and Holz, A.** (2012). The role of LamininB2 (LanB2) during mesoderm differentiation in *Drosophila*. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 267–82.
- Wong, M.-C., Dobi, K. C. and Baylies, M. K.** (2014). Discrete levels of Twist activity are required to direct distinct cell functions during gastrulation and somatic myogenesis. *PLoS One* **9**, e99553.
- Woolner, S., Jacinto, A. and Martin, P.** (2005). The small GTPase Rac plays multiple roles in epithelial sheet fusion - Dynamic studies of *Drosophila* dorsal closure. *Dev. Biol.* **282**, 163–173.

- Wu, X., Golden, K. and Bodmer, R.** (1995). Heart development in *Drosophila* requires the segment polarity gene *wingless*. *Dev. Biol.* **169**, 619–28.
- Xu, X., Yin, Z., Hudson, J. B., Ferguson, E. L. and Frasch, M.** (1998). Smad proteins act in combination with synergistic and antagonistic regulators to target Dpp responses to the *Drosophila* mesoderm. *Genes Dev.* **12**, 2354–2370.
- Yamazaki, H. and Nusse, R.** (2002). Identification of DCAP, a *drosophila* homolog of a glucose transport regulatory complex. *Mech. Dev.* **119**, 115–9.
- Yamazaki, H. and Yanagawa, S. I.** (2003). Axin and the Axin/Arrow-binding protein DCAP mediate glucose-glycogen metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 229–235.
- Yarnitzky, T. and Volk, T.** (1995). Laminin is required for heart, somatic muscles, and gut development in the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.* **169**, 609–18.
- Yin, Z. and Frasch, M.** (1998). Regulation and function of tinman during dorsal mesoderm induction and heart specification in *Drosophila*. *Dev. Genet.* **22**, 187–200.
- Yin, Z., Xu, X. L. and Frasch, M.** (1997). Regulation of the twist target gene tinman by modular cis-regulatory elements during early mesoderm development. *Development* **124**, 4971–82.
- Zaffran, S. and Frasch, M.** (2002). Early signals in cardiac development. *Circ. Res.* **91**, 457–69.
- Zaffran, S., Xu, X., Lo, P. C., Lee, H. H. and Frasch, M.** (2002). Cardiogenesis in the *Drosophila* model: control mechanisms during early induction and diversification of cardiac progenitors. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **67**, 1–12.
- Zaffran, S., Reim, I., Qian, L., Lo, P. C., Bodmer, R. and Frasch, M.** (2006). Cardioblast-intrinsic Tinman activity controls proper diversification and differentiation of myocardial cells in *Drosophila*. *Development* **133**, 4073–4083.
- Zamir, E. and Geiger, B.** (2001). Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* **114**, 3583–3590.
- Zeitouni, B., Sénatore, S., Séverac, D., Aknin, C., Sémériva, M. and Perrin, L.** (2007). Signalling Pathways Involved in Adult Heart Formation Revealed by Gene Expression Profiling in *Drosophila*. *PLoS Genet.* **3**, e174.
- Zhang, M., Kimura, A. and Saltiel, A. R.** (2003). Cloning and Characterization of Cbl-associated Protein Splicing Isoforms. *Mol. Med.* **9**, 18–25.
- Zhang, M., Liu, J., Cheng, A., Deyoung, S. M., Chen, X., Dold, L. H. and Saltiel, A. R.** (2006). CAP interacts with cytoskeletal proteins and regulates adhesion-mediated ERK activation and motility. *EMBO J.* **25**, 5284–93.

Zhang, M., Liu, J., Cheng, A., Deyoung, S. M. and Saltiel, A. R. (2007).
Identification of CAP as a Costameric Protein that Interacts with Filamin C □. **18**,
4731–4740.

Anhang

Die zu der Abbildung 20 zugehörigen Filme S1 und S2 sind auf der CD-ROM zu finden.

Film S1: KontrolleHandGFP10x.avi

Film S2: CAP49eHandGFP10x.avi

Tabelle 17 Verwendete Oligonukleotide für den *in situ* Screen

Gen	Oligonukleotid	Nukleotid-Sequenz 5'-3'
A3-3	A3-3F	CAGTCTGCTTTCCGACTACGTT
	A3-3R	ATTATTGTTGCCGGTGCTCCC
alpha-catenin-rel	alpha-catenin-relF	CTCAGCATCAGCATCTCTGTC
	alpha-catenin-relR	GAAAATCGATTGAACGACTTTGTG
APC7	APC7F	CGTGAAGCTCCTTGGCG
	APC7R	CTGCCACGGTGCCC
asrij	asrijF	AGTCCAGGGTGGGGC
	asrijR	GCGGACTATCAGTTTTCTGC
baldspot	baldspotF	TTACTGCGCCTTGGC
	baldspotR	GTATCACCACATCACCGTG
b-spectrin	b-spectrinF	GCTCGCCAACGGTG
	b-spectrinR	TTTAAATAAATAAGATACATACGTTTAATCATAATAGC
bves	bvesF	ATTGGTCCATCGAACAGTGCCT
	bvesR	AAAAGTCCCATGCCCCGACCAC
Calx	CalxF	CTGCCACTCTGGATGCCGCAAC
	CalxR	CCAGGTCCCAAGTCACCGCTCT
CAP	CAPF	ATGCCCAATAACCGCAATC
	CAPR	TTTGGACTCGGTTCATTTTCC
Ca-P60A	Ca-P60AF	CCCCATGAAGCCCGACGAGA
	Ca-P60AR	GGCGTCGTTACACCATCACC
Ced-12	Ced-12F	GCTCACTCCCTAAGCACCGAT
	Ced-12R	CAGCTTGATGTCCTCGGCAAC
CG10188	CG10188F	AGCCTCTGATACGTTCCGAT
	CG10188R	ACCATATGCTGTTGCGGTTG
CG10743	CG10743F	GCACATACCTCGTCAGGATTCCG
	CG10743R	AATGGCGCTACCTCCATCGTT
CG11526	CG11526F	GCAGCTTCGCCAACGTCCA
	CG11526R	TCGCCACTCAAATCCGGTTGCT
CG11576	CG11576F	TTAGCAGTTCGACTCTGCG
	CG11576R	AAGGGAGTACGCCAGGT
CG11665	CG11665F	AATGCCATAAGCTACACGAA

Gen	Oligonukleotid	Nukleotid-Sequenz 5'-3'
CG1416	CG11665R	TAATCATTGACCGCCTCGAAC
	CG1416F	AACAATCGCAAGGGCAAGCTC
	CG1416R	CCCTCGTAAAGGCAGTGACCA
CG15373	CG15373F	TTAACATAGACTCAGCGGTCG
	CG15373R	TCCCGGCACCATCATC
CG16721	CG16721F	CTGCTGTCGCCCAACAACGAA
	CG16721R	CTCCTTCTCATACTGCACCGAAT
CG17378	CG17378F	CCAAGCTGCCGAAATGC
	CG17378R	GCTCCAGCAGCAGCG
CG17471	CG17471F	AGAAAACATGCCGTCACA
	CG17471R	CGGATGGTATTGCTTTAAAAATGCG
CG17528	CG17528F	ATTCACTCTTTCCGGTATCCCA
	CG17528R	CTATGTAGTGTTCCCTTGCCCTT
CG1893	CG1893F	CATTATAATCGCCGACTGCTT
	CG1893R	TCACTAGGCCACTCTAATGGG
CG1942	CG1942F	CATTGGCATTAAACATGGGCTT
	CG1942R	AGCCTTTCCTATTCTTCAAGGTT
CG30340	CG30340F	CACTGTTTCATTGTGGTCGTT
	CG30340R	ATAAATCCGTCTGCCTCGAT
CG32528	CG32528F	CGGCTTTCACCAAAAAGATTCCC
	CG32528R	GCACAAAGAATCCACCGAGCA
CG33291	CG33291F	ACTGACCGCTCTGATGATCG
	CG33291R	TGATCCTCTCACACCGCCAC
CG34191	CG34191F	AAGTAACCTTCAAAATCACGCTA
	CG34191R	TTAGTTGGTGGCCCACTCG
CG3494	CG3494F	TTATATAGGAATGCGGGTGCG
	CG3494R	GTAATCCTCGACATGTATATGGTTTG
CG3609	CG3609F	GATTGACTTCTGGTCGCCCAA
	CG3609R	TTATTATGTTAGGTTTACACGTT
CG4656	CG4656F	GACCACTGAATCAAGCTCGACT
	CG4656R	ATCGCTGAATTCTCGCCGTA
CG4946	CG4946F	CGTGCACAGCTAGCCAG
	CG4946R	ATCTCTCCATCGGCATAAAAATAC
CG5367	CG5367F	CTGACCCATGATGCTCTCG
	CG5367R	AGCACAGATGGTTACCTCAAGG
CG5890	CG5890F	CTGATCCCTCGCCTTG
	CG5890R	ATTCAAGTTTATACGCTCATTATGTG
CG6856	CG6856F	TGTTCTGGGAACCTGAAAAAG
	CG6856R	CTGCTTACCCATTTCTCCA
CG7049	CG7049F	TCACGCATTCTTGGC
	CG7049R	TTAAGATGACAACAATTATATTAGTCCTC
CG7097	CG7097F	AATTACTCGTAGGCTAAGCAG
	CG7097R	CTCGTTCTTGATTTTCCGTTG
CG7656	CG7656F	CTCTGGATCCTTGGCGACCTC
	CG7656R	ATGCACAGATCACCGTTCTCGT
CG7945	CG7945F	CTGTTCTGGGACAACTCTCA

Gen	Oligonukleotid	Nukleotid-Sequenz 5'-3'
	Cg7945R	ATGCTGCTTTCTTTATTATTCGT
CG8312	CG8312F	CCAACGCCGTCTACGATAAT
	CG8312R	GTCTGAATCGGAGCCATCAT
CG9593	CG9593F	CTAATCCCCATCAGAGTTATCG
	CG9593R	CCGCACGAAAATTTCAATC
Clic	ClicF	TTTGTTCTGCCAGGAGTACTTCA
	ClicR	CGGCATCAGCTCACAGTCG
cont	contF	ATTGTAGATTGGAACAGATTGAC
	contR	CCTGTGGCCAATGAGTT
coro	coroF	CTCGAAATACCGAATGACC
	coroR	GTCGTGATTTGGAACGTG
cpo	cpoF	ATCCGTTGCTGCTGTCCCGACCA
	cpoR	AGTCCATGCTCTGCGAAAGTCCC
CycG	CycGF	GGTTGTACCGCTGGTGATCT
	CycGR	CGGGTGTACGACTCCTTGAT
Cyp9f2	Cyp9f2F	CAATGCAGTTGCGTTGACC
	Cyp9f2R	ATCCTTAAGGTCGAGCTTTTCG
dac	dacF	TAAACAAAAGTGTCGGCCATG
	dacR	TGAGCAACTGGATCCTCGTC
exba	exbaF	GAAGTACTGCCCACTGTTGC
	exbaR	TGACTGAAGCCATTTCGACA
Fer3HCH	Fer3HCHF	GCCTACCATTTCGATCG
	Fer3HCHR	TCATTTTCGCAGGATGCAT
Fim	FimF	CGTAAATTTGTCGTATTCGCTA
	FimR	TTAAGGATTTTAAGCGGAAC
Gel	GelF	CTCACTCAGGCTATGCTCGAC
	GelR	TGAACCCAAAGGCACGACCAC
GlyP	GlyPF	ACTTCATGTTGCCGGTACCAG
	GlyPR	AACCCCTCTTCCATGTTTCGAC
HDAC4	HDAC4F	CCTCCGCCACAAAGTCCGGTA
	HDAC4R	ACACGCTCTGCAGTCGACCAC
Hey	HeyF	ACTCGCTTAGCTATGATCCG
	HeyR	CTTCCAATTGTCCGCGAGA
homer	homerF	AGAATGCCATGAAATCGGCCAAC
	homerR	CAATGCTTCCGCCAGACGAGA
hop	hopF	TCGGAAATATCCTTTCTCGTT
	hopR	CAACACACGGTAATTTACAAA
Hr38	Hr38F	GTTTCTGTCCGTTGTTTGTCC
	Hr38R	AACTAGCCCCTAAGTTATGCC
hts	htsF	GGTACATGCTGCCCGTCCAGA
	htsR	AGTGCGATAGCCAGCATTGTCCA
jp	jpF	CAAACTAGGCCAAATGCAAG
	jpR	CTTTCCGTATTCAATTTTCGTT
Klp31E	Klp31EF	GTCCTCGAACTCCATTATGGC
	Klp31ER	AACAATCTAACCGACACAAGC
ksr	ksrF	GACTGCTTCATCCCACGGCCAA

Gen	Oligonukleotid	Nukleotid-Sequenz 5'-3'
	ksrR	AGTTTGCCATGAACCGGACTCT
lace	laceF	AGCTTCTACTCGAGGTACGTT
	laceR	CTGAAGATGCCCTCGACCA
lute	luteF	ACTTCTCAGTCAATCGCGTCT
	luteR	TGGGTCTTTAATCCCGCCCTG
LysP	LysPF	GACGCTTCTCCTACAACGAGT
	LysPR	TGGCTATTGTTGACTTTATCCG
MAPK-AK2	MAPK-AK2F	CCACCCCACTGACGGACGACT
	MAPK-AK2R	CCTCCCGCTCCGTAAAGGCA
Mbs	MbsF	AGCATAGCTCGGTATTTGGT
	MbsR	CCAGCACTTTCGTGTAACCT
Mical	MicalF	CAAATGCCAAACCTGGAGTT
	MicalR	TTAAGCAGCCGGTAGATGCT
Mlc2	Mlc2F	CTGACCCTGTTGCGCAACC
	Mlc2R	GGTTCTTGTCGTCGATCACCA
Mlc-c	Mlc-cF	ACAACGACCAAGGATATCGAG
	Mlc-cR	CCACCGACGCATATCAGCTT
Nep3	Nep3F	AGGCCAACCAGATTTCCGACA
	Nep3R	TCGTTAAACCGCTCGATGCTCT
Nrk	NrkF	TGTCGATTTGAACACGCCCAT
	NrkR	ATCAGACACATTGGTCACCGTA
orb	orbF	TTCAATAGCGATTTTGTATATTG
	orbR	ATACTTCTGCCGCAGCTG
Orc6	Orc6F	CTAAGCCTCGAGAAGCTG
	Orc6R	GAAAACCACCGAACTAGTACG
pico	picoF	CGGAGCTCTACTTACCCGGACCC
	picoR	GTCCCACTGCTTGCCGTA
pk	pkF	TTCCAATCAGAGCCGAGGTT
	pkR	TTCATTAGCCCAATCGTCAGC
plexA	plexAF	ACCATTTGAGCTTTACCCAA
	plexAR	TCCAGAAGTAAGATCGCCTGT
Ptx1	Ptx1F	GTCAGCATGAACAACGCATC
	Ptx1R	TTGCATCCCATTGCGCACC
Rgk1	Rgk1F	AAGTTTCATTGCGCGGAC
	Rgk1R	TCCCCGCAAATACCGTG
Rtnl2	Rtnl2F	GCACATACCAAATATAAGCAA
	Rtnl2R	ATAGCCGAAAGACTTTGATCG
SelR	SelRF	TTGCTACAACAAACACTACG
	SelRR	GGTATGCTGGCATCGC
shep	shepF	CAAAAGAAACAGCGGCAAG
	shepR	TTTGTTCGTTTTTATTTGCTCT
Sip1	Sip1F	TGGAAGTAAACCTCATCGC
	Sip1R	GTAGGTGCTCCATCATATCCG
SKIP	SKIPF	CGGTGTTGAGTATGGATGC
	SKIPR	ATGGCCGTTAGCAATATTGT
slbo	slboF	CACACTGACGGCCATGTCCAC

Gen	Oligonukleotid	Nukleotid-Sequenz 5'-3'
	slboR	ATGCCCAGCGTTTCCGTGTCC
SNF4Agamma	SNF4AgammaF	CCCGCCTCGCAGTCCATCG
	SNF4AgammaR	TCTTGCGCTCAATCTCCGCTA
Sox15	Sox15F	TCAAGGGCACATTCTATCCAC
	Sox15R	GTATCCGCCATAGTTGCCGTA
sqa	sqaF	CTACTTGCCCGCCGC
	sqaR	CATCTGTTGCTCCTTCTGGC
sqh	sqhF	ATCCTCGTCTGTGAACCGATC
	sqhR	ATCCACGCCGCACACAC
Syx1A	Syx1AF	CTTGTGAGCGAAATAACACCA
	Syx1AR	CTATCCTTGTTTACGGTGCG
szar	szarF	CGTCAGTTTCTTGCCCGTCT
	szarR	AGCACTCTACGAGCAACGACT
Tie	TieF	TACATCCAGGGGAAATAGCT
	TieR	TACTTCAATCACCGGATCTCG
tin	tinF	GGTCTTAAGCTTTATTTATTGTCCAA
	tinR	AGTACCAAAATCGAGCTGACAAATT
Trim	TrimF	AATCGAAATTGTGCGGTTT
	TrimR	TGGTTATAATCCGCAAGAGC
Tsp96F	Tsp96FF	CCGATGGACCTGGAGATTG
	Tsp96FR	CTGCTGATAAATGGCGTTGTT
Tsp97E	Tsp97EF	TTCATGCTGTTCTTGATCCA
	Tsp97ER	GCTGAAGAAGATGCCCAGAC
Tsp	TspF	TGCAGGCGGATGAGG
	TspR	GGTTCCTACAGATGCCAATG
unc-89	unc-89F	GGGCATCCAGAAGTCCAC
	unc-89R	AGTAGGTCAGCGCTCCCAG
up	upF	AGTTCATCAAGCGTCAGGACCAG
	upR	CGCCTGCATCCTTCTTGGCAAT
vri	vriF	AGTAAGCAAGCCCCTGTCCAA
	vriR	TCTCCACTTTCGCTGTGCAT
Zasp52	Zasp52F	ATGGACATCGAGGTGGC
	Zasp52R	TGGGGTAACTCCTTAATCTCAG
zip	zipF	CTTATCCATTTGCTCCTTGTGC
	zipR	GTGCTCGAATTGGAGAAAAAAC

Tabelle 18 Übersicht der Expressionsdaten des *in situ* Screens

FlyBase ID	<i>Drosophila</i>	Ortholog Zebrafisch	Ortholog Mensch	<i>in situ</i> Expression (BDGP)	<i>in situ</i> Expression (diese Arbeit)
FBgn0028550	A3-3	zgc:92851	JDP2	m, dlsc, u, vg, mxsc, lis	m, vg, br, u, dv
FBgn0029105	alpha- catenin- related	si:ch211-254e15.1	CTNNAL1	vg, br, AntSen	AntSen
FBgn0029879	APC7	atp2a2a	ANAPC7	m	m, schwach u bis Stadium 6, späte Stadien kein Signal
FBgn0034793	asrij	ociad2	OCIAD2	m	m, u, mg, hg
FBgn0260960	Baldspot	elovl6	ELOVL6	fg, es, cns, mg, vg, hg, br	fg, hg, ps, br, vg
FBgn0250788	beta-Spec	sptb	SPTB	keine Daten	kein Signal
FBgn0031150	bves	popdc1	BVES	kein Signal	u
FBgn0013995	Calx	slc8a1b, slc8a2b, slc8a4a	SLC8A1	m, ec	m, u, br, hg, dv
FBgn0033504	CAP	LOC563408	SORBS2	vm, dlsc, dv, glc, hEpi	vm, dv, glc, mg, hg dpm, lpm
FBgn0263006	Ca-P60A	atp2a2a	ATP2A2	m, u, fg, mg, hg, sg, mu, vm, dpm, lpm	m, u, dv, mu
FBgn0032409	Ced-12	elmo1	ELMO1	u, vg, br	u, vg, br
FBgn0032796	CG10188	arhgef1	ARHGEF 2	keine Daten	m, schwach u, späte Stadien kein Signal
FBgn0036376	CG10743	si:dkey-207j16.2	PPFIBP1	keine Daten	u, mg, hg
FBgn0035437	CG11526	fam40a	FAM40A	keine Daten	u, br, hg, dv
FBgn0039882	CG11576	zgc:136909	C20orf54	mg, cc, yn, as	mg, cc, yn
FBgn0033028	CG11665	slc16a3	SLC16A3	u	kein Signal
FBgn0032961	CG1416	ahsa1	AHSA1	mg, hg,	mg, hg
FBgn0030889	CG15373	casc1	CASC1	keine Daten	kein Signal
FBgn0029820	CG16721	zgc:73347	TCP11L2	m, schwach u	m, u, dv
FBgn0031858	CG17378	zgc:91860	KIAA0513	kein Signal	kein Signal
FBgn0039924	CG17471	LOC560360	PIP5K2A	u	u
FBgn0261387	CG17528	dclk1	DCAMKL 1	keine Daten	m, schwach u in frühen Stadien, späte Stadien kein Signal
FBgn0035390	CG1893	plscr3a	PLSCR1; PLSCR2; PLSCR4	glc, fg, hg, mg, u, cf	fg, mg, hg, schwach u, cl, ps
FBgn0033215	CG1942	zgc:101757	MOGAT3	head ms, as, yn,	head ms, as
FBgn0050340	CG30340	ednra	EDNRA	keine Daten	kein Signal
FBgn0052528	CG32528	parvaa	PARVA	keine Daten	m, mg, hg, vm
FBgn0264711	CG33291	A0PJR1_DANRE	ABTB2	keine Daten	kein Signal
FBgn0085220	CG34191	ufm1	UFM1	keine Daten	mg, hg,
FBgn0035008	CG3494	lrrc10	LRRC10	keine Daten	u, mg, hg, dv

FlyBase ID	<i>Drosophila</i>	Ortholog Zebrafisch	Ortholog Mensch	<i>in situ</i> Expression (BDGP)	<i>in situ</i> Expression (diese Arbeit)
FBgn0031418	CG3609	dhdhl	DHDH	m, u, midgut	ms
FBgn0039055	CG4656	rassf6	RASSF6	keine Daten	m
FBgn0259482	CG4946	mobkl2c	MOBKL2 C	m	m, schwach u, späte Stadien kein Signal
FBgn0032228	CG5367	ctsk	CTSK	keine Daten	kein Signal
FBgn0039380	CG5890	kcnip1b	KCNIP1	keine Daten	kein Signal
FBgn0036819	CG6856	dtnbp1b	DBNDD2	sg, u	kein Signal
FBgn0035102	CG7049	sumf2	SUMF2;P HKG1	keine Daten	m, u
FBgn0263395	CG7097	map4k2l	MAP4K2	pp, m	m
FBgn0036516	CG7656	cdc34a	CDC34	u, br	u, br
FBgn0036505	CG7945	bag2	BAG2	m	m
FBgn0037720	CG8312	zgc:77057	FAM43A	as,hEpi, dEpi, vEpi	u, Epi, ts
FBgn0038365	CG9593	angpt1	ANGPT1	keine Daten	kein Signal
FBgn0030529	Clic	clic2	CLIC2	u, hg, mg, pv	u, hg, mg, pv
FBgn0037240	Cont	zgc:55318	CNTN5	fg, eph, hg, vEpi, at, hEpi, hy	fg, eph, hg, vEpi, at, hEpi, hy
FBgn0265935	coro	coro1a	CORO1A; CLDN4;C LDN3	dpm, lpm, mu, vm	kein Signal
FBgn0263995	cpo	zgc:92689	RBPMS2	dlsc,mx, lis, Antsen, rgl, hEpi	dv, dlsc, rgl, hEpi
FBgn0039858	CycG	ccng2	CCNG2	keine Daten	kein Signal
FBgn0038037	Cyp9f2	cyp3c1l2	CYP3A5; CYP3A4; CYP3A7; CYP3A43	mg, yn	mg, yn
FBgn0005677	dac	dacha	DACH2	vg, hg, br, cns, lrs	br
FBgn0250753	exba	bzw2	BZW2	m, u	m, ph, hg, mg schwach u
FBgn0030449	Fer3HCH	zgc:109934	FTH1;FT MT;AJ239 329.2;FT HL17	keine Daten	kein Signal
FBgn0024238	Fim	lcp1	LCP1	m, ms	as, vg, br, ms, dv, hg, cf, vm
FBgn0010225	Gel	capg	CAPG	vm of es, vm, mg	vm of es, vm, mg, hg
FBgn0004507	GlyP	pygb	PYGB	mus	kein Signal
FBgn0041210	HDAC4	hdac9b	HDAC9	keine Daten	schwache Expression: mg, hg, fg, dv
FBgn0027788	Hey	hey2	HEY2	vg, br	vg, br
FBgn0025777	homer	homer1	HOMER1	mg, u, vg, br, cns	m, br, vg, cns, mg
FBgn0004864	hop	jak1	JAK1	keine Daten	kein Signal
FBgn0014859	Hr38	nr4a1	NR4A1	kein Signal	kein Signal
FBgn0263391	hts	add3a	ADD3	keine Daten	u
FBgn0032129	jp	jph2	JPH2	mu	mu

FlyBase ID	<i>Drosophila</i>	Ortholog Zebrafisch	Ortholog Mensch	<i>in situ</i> Expression (BDGP)	<i>in situ</i> Expression (diese Arbeit)
FBgn0032243	Klp31E	A2RV26_DANRE	KIF21A	m	kein Signal
FBgn0015402	ksr	si:busm1-122b7.1	KSR1	keine Daten	kein Signal
FBgn0002524	lace	sptlc2	SPTLC2	m, mg	m, mg
FBgn0262871	lute	LOC556897	BTBD6	u	u
FBgn0004429	LysP	lyz	LYZL6;LYZL2;LYZL1;LYZL4;SPACA5;SPACA5B	mg	kein Signal
FBgn0013987	MAPk-Ak2	zgc:158342	MAPKAP K3	keine Daten	m, lg, ps, mg, hg
FBgn0005536	Mbs	ppp1r12a	PPP1R12 A	vm des es, dpm, lpm, vm, mu	u, dv
FBgn0053208	MICAL	micall2	MICALL1	mg	vm, fg, hg, mg
FBgn0002773	Mlc2	myl7	MYL7	mu	mu
FBgn0004687	Mlc-c	cmlc1	MYL4	m, u	m, u, dv, mu, hg, dpm, lpm
FBgn0031081	Nep3	zgc:154079	ECE1	keine Daten	m, br, vg, cns, hg, mg
FBgn0020391	Nrk	musk	MUSK	keine Daten	br, vg
FBgn0004882	orb	zorba	CPEB1	go, pc, vg, br	m, u, pc, dv
FBgn0023180	Orc6	orc6	ORC6L	u, vg, br	br, vg
FBgn0261811	pico	LOC562032	GRB10	keine Daten	dv, fg, hg
FBgn0003090	pk	prickle2	PRICKLE 2	keine Daten	br, vg, cf, hg, dv
FBgn0025741	plexA	plxna4	PLXNA4	keine Daten	m, u, br, vg, cns, hg, mg, fg
FBgn0020912	Ptx1	pitx2	PITX2	mg, vg, hg, br, mp, cns, mu	mg, vg, hg, br, mp, cns, mu
FBgn0264753	Rgk1	rrad	RRAD	u, glc, hg	schwach u, glc, hg
FBgn0015831	Rtnl2	rtn2b	RTN2	keine Daten	kein Signal
FBgn0037847	SelR	msrb3	MSRB3	vm	kein Signal
FBgn0052423	shep	rbms3	RBMS3	cns, vg, glc, cc, br	kein Signal
FBgn0010620	Sip1	slc9a3r2	SLC9A3R 1	fg, es, eph, hg, vEpi, dEpi, at, hEpi, hy	u, dv, at, hg, eph, hph, es
FBgn0051163	SKIP	samsn1a	SAMSN1	cns, mg,vg, hg, br	cns, mg,vg, hg, br
FBgn0005638	slbo	cebpa	CEBPA	hEpi, ps, vEpi, dEpi	ps, Epi, dv
FBgn0264357	SNF4Agamm a	zgc:153329	PRKAG2	mg,u	mg,u
FBgn0005613	Sox15	sox7	SOX7	dlsc	dlsc
FBgn0259678	sqa	mylk2; mylk3	MYLK2; MYLK3	mu	mu, dv, hg, br
FBgn0003514	sqh	myl9	MYL9	m, u	m, u, fg, hg, dv
FBgn0013343	Syx1A	zgc:101111	STX2	vg, u, br	m, u, vg, br
FBgn0250785	szar	mpp2b	MPP2	fg, es, eph, u, hg, vEpi,	kein Signal

FlyBase ID	<i>Drosophila</i>	Ortholog Zebrafisch	Ortholog Mensch	<i>in situ</i> Expression (BDGP)	<i>in situ</i> Expression (diese Arbeit)
				at, dEpi , hEpi, hy	
FBgn0014073	Tie	tie1	TIE1	kein Signal	m, hg, mg, u
FBgn0051721	Trim9	trim55b	TRIM55	mg, vg, br, cns	mg, vg, br, cns
FBgn0031850	Tsp	thbs3b	THBS3	eph, hEpi	eph, hEpi
FBgn0027865	Tsp96F	cd9a	CD9	m, mg, hg, fb, vEpi, sg	m, pv, mg,
FBgn0039465	Tsp97E	tspan13	TSPAN13	m, vg, br	m, br, vg
FBgn0053519	Unc-89	spep	SPEG	keine Daten	kein Signal
FBgn0004169	up	tnnt2a	TNNT2	mu, vm	mu, vm
FBgn0016076	vri	nfil3	NFIL3	at, es, hEpi, hg, ps, vEpi	at, es, hEpi, hg, ps, vEpi
FBgn0265991	Zasp52	ldb3a	LDB3	m, mg, eph, dv, hy, mu, schwach u	m, u, mg, hg, dv
FBgn0265434	zip	myh11	MYH11	m, mg, dv, hEpi, mu, vm	m, mg, dv, hEpi, mu, vm

kein Signal: es konnte kein *in situ* Signal detektiert werden.

Abkürzungen nach (Hartenstein, 1993):

Antsen: antennal sense organ; *as*: amnioserosa; *at*: atrium; *br*: brain; *cc*: crystal cell; *cl*: clypeolabrum; *cns*: central nervous system; *ec*: ectoderm; *dEpi*: dorsal epidermis; *dlsc*: dorsal/lateral sensory complex; *dpm*: dorsal pharynx muscle; *dv*: dorsal vessel; *eph*: Epipharynx; *es*: Esophagus; *Epi*: epidermis; *fb*: fat body; *fg*: foregut; *glc*: garland cells; *go*: gonads; *hEpi*: head epidermis; *hg*: hindgut; *hph*: Hypopharynx; *lbr*: labral sensory complex; *lis*: labial sensory complex; *lpm*: lateral pharynx muscle; *m*: maternal; *mg*: midgut; *ms*: mesoderm; *mu*: somatic muscles; *mx*: maxillar sensory complex; *pc*: pole cells; *pp*: pole plasm; *ps*: posterior spiracles; *pv*: proventriculus; *rg*: ring gland; *sg*: salivary gland; *ts*: tracheal system; *u*: ubiquitous; *vEpi*: ventral epidermis; *vg*: ventral nerve cord; *vm*: visceral muscles; *yn*: yolk nuclei

Danksagung

Ich möchte herzlich Prof. Harald Saumweber danken für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, und auch für den Gedankenaustausch und die zahlreichen Anregungen während der gesamten Zeit.

Für die finanzielle Förderung meiner Arbeit danke ich dem TRANSCARD Programm des Max-Delbrück Zentrums sowie der FAZIT-Stiftung.

Dr. Ingolf Reim möchte ich danken für seine Diskussionsbereitschaft und die vielen Fliegenlinien sowie Antikörper, die er mir zur Verfügung gestellt hat.

Prof. Salim Seyfried danke ich für die Bereitstellung der Zebrafisch-Daten und für die motivierenden und vor allem auch inspirierenden Gespräche.

Mein Dank gilt Prof. Achim Paululat und Dr. Maik Drechsler für die freundliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe und die Unterstützung bei den Injektionstests.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Bettina Purfürst und der Arbeitsgruppe Elektronenmikroskopie am Max-Delbrück Zentrum für die Unterstützung bei den Semidünnschnitten und den TEM-Analysen bedanken.

Vielen Dank an alle Kollegen der Arbeitsgruppe Zytogenetik für das familiäre Arbeitsklima und die unvergesslich schöne Zeit. Die Arbeit mit euch allen hat sehr viel Spaß gemacht. Dabei danke ich Prof. Ansgar Klebes und Dr. Dereje Negeri für ihre Diskussionsbereitschaft und ihre motivierenden Worte. Mein Dank gilt im Besonderen auch Thomas, Irina und Petra für die schönen Momente im Labor.

Ich danke meiner Familie und meinen vielen lieben Freunden, die mich in all den Jahren begleitet, unterstützt und mich im positiven Sinne immer wieder abgelenkt haben.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern sowie meinem Mann und meinem Sohn für ihre Liebe sowie die Unterstützung und den Rückhalt und dafür, mich auch in schwierigen Situationen immer wieder aufzurichten.

Wissenschaftliche Beiträge

Publikationen

John, T., Lodka, D., Kohl, B., Ertel, W., **Jammrath, J.**, Conrad, C., Schulze-Tanzil, G. (2010). Effect of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines on human tenocytes. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 28(8), 1071–1077. doi:10.1002/jor.21079

Jammrath, J., Reim, I., Saumweber, H. (2015). The *Drosophila* CAP protein, an ortholog of the mammalian CAV proteins, is essential for proper heart function in *Drosophila*. (in preparation)

Beiträge zu wissenschaftlichen Tagungen

Poster:

Jammrath, J., Negeri, D., Saumweber, H. (2011). Failure of Notch signaling causes dramatic effects in heart development of *Drosophila melanogaster*. CMD und TransCard Retreat 2011

Jammrath, J., Negeri, D., Saumweber, H. (2011). Misregulation of Notch signaling causes dramatic effects in heart development of *Drosophila melanogaster*. 22nd European Drosophila Research Conference (EDRC) in Lissabon, Portugal.

Jammrath, J., Saumweber, H. (2013). A candidate screen identified *CAP* as a novel gene involved in *Drosophila* heart development. 23rd European Drosophila Research Conference (EDRC) in Barcelona, Spanien.

Berlin,

.....

(Jennifer Jammrath)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form bei keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin,

.....

(Jennifer Jammrath)